



Mul Fedele, Malena Lis

# El Rol del TNF- $\alpha$ en la comunicación inmune-circadiana durante la estimulación inmune aguda y crónica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

*by Mul Fedele, M. L. (2019). Rol del TNF- $\alpha$  en la comunicación inmune-circadiana aguda y crónica. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2091>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## **Rol del TNF- $\alpha$ en la comunicación inmune-circadiana durante la estimulación inmune aguda y crónica**

*TESIS DOCTORAL*

**Malena Lis Mul Fedele**

malenamulfedele@gmail.com

### **Resumen**

En la presente tesis se estudió la interacción bidireccional entre el sistema inmune y el circadiano, poniendo especial énfasis en el rol de la citoquina TNF-  $\alpha$  en esta comunicación. En relación a la modulación del sistema circadiano por parte del sistema inmune, se utilizó en una primera instancia un modelo de inflamación aguda con dosis bajas de LPS, el cual se había demostrado que era capaz de inducir alteraciones sobre el reloj circadiano, estudiando de esta forma cómo el sistema inmune puede alterar su funcionamiento. Este modelo no puede considerarse patológico, ya que las dosis de LPS utilizadas son muy bajas, y no son capaces de generar una respuesta inflamatoria significativa. Posteriormente, se evaluó un modelo de inflamación crónica como lo es el asma bronquial, el cual, hasta el momento, no había sido estudiado desde el punto de vista circadiano.

En el otro sentido de la interacción, se utilizó un modelo de inflamación aguda pero en este caso con dosis altas de LPS capaces de inducir sepsis. Este modelo fue elegido dado que desencadena una respuesta diferente en el organismo de acuerdo al horario en el que el LPS es administrado. A través de este modelo, se deseaba analizar en mayor profundidad cómo el reloj circadiano es capaz de modular la respuesta a un estímulo inmune.

# **ROL DEL TNF- $\alpha$ EN LA COMUNICACION INMUNE-CIRCADIANA DURANTE LA ESTIMULACION INMUNE AGUDA Y CRONICA**

**Autora: Lic. Malena Lis Mul Fedele**

**Directora: Dra. Natalia Paladino**

Trabajo de tesis para optar por el título de  
Doctor en Ciencia y Tecnología de la  
Universidad Nacional de Quilmes

---

**Laboratorio de Cronobiología  
Departamento de Ciencia y Tecnología  
Universidad Nacional de Quilmes**





## **AGRADECIMIENTOS**

Hay muchísima gente que me acompañó en este recorrido, a través de su ayuda con algún experimento o simplemente compartiendo una charla o un mate. Les agradezco a todos, aunque no los nombre uno por uno, pero en particular quisiera darle las gracias...

A Diego y Naty, que confiaron en mí cuando era una estudiante y me dieron esta oportunidad. A Diego, que además de formarme con espíritu crítico (una de las mayores enseñanzas que me llevo de este doctorado), me tuvo infinita paciencia. Además, nos empujó y ayudó a dar nuestros primeros pasos en la divulgación, un espacio que disfrutamos mucho y en el que aprendemos aún más. A Naty, por su paciencia en los primeros tiempos cuando tenía todo por aprender, y en estos últimos tiempos cuando ya la cabeza no me daba para más. Por enseñarme a ser prolija y exigente con mis experimentos, por todo lo que aprendí en estos años, por muchas veces hacerme sentir una hija más.

A Juan por las discusiones infinitas sobre temas infinitos, sus recomendaciones de lugares para visitar en cualquier parte del mundo, por estar siempre dispuesto a dar una mano y sacarme una sonrisa esos días que el ánimo no ayudaba. A Santy que fue de los primeros en explicarme que “acá se trabaja en equipo”, que es importante aprender a hacer todo y, sobretodo por enseñarme que somos una familia, con todo lo que eso implica. Gracias a ambos porque son familia, amigos y ejemplos de científicos para mí.

A Pato, siempre al pie del cañón, ofreciendo su ayuda para cualquier situación. Juli y el Flaco, los antecesores. Juli siempre presente, contagiando su buen humor, con ganas de escuchar en “qué anda la línea” e intentar pensar (y dibujar) posibles vías que expliquen los resultados. El Flaco, continuamente pensando experimentos nuevos y ayudando a que se concreten.

A Anas, Andre, Sole, Euge, Juli, Meli, Lau, Ro, Fran, Jhony, Ferchu, por cada almuerzo, charla, mate, café compartidos. Porque cuando hay buena onda, los años se pasan volando y los días aun más.

A Ivi, Lea y Charly, el primer “equipo” con el que nos largamos a la divulgación, con todos los dolores de cabeza y alegrías que nos trajo. ¡GRACIAS!!! Sin ustedes no me hubiera animado. Ivi, compartimos tanto que siento que nos conocemos de toda la vida, sos increíble amiga y compañera, y

tengo mucha suerte de haberte cruzado. Charly, nos tocó hacer el doctorado codo a codo y creo que no me podría haber tenido mejor compañero. Siempre dispuesto a ayudar, a diseñar algoritmos, a acompañar en los overnights, a hacer tragos, asados, etc. Lea, detrás de ese rudo se esconde una de las personas más dulces que conozco, siempre con la palabra y el pasito de baile justo. Simplemente gracias a los tres por estar siempre (en persona y ahora a la distancia).

Jose, de esas personas que te enseñan a pensar mucho más en el que tenés al lado. Lucho, tu sinceridad y tus asados son lo más. Agus, gran compañero de gritos y carcajadas. Lu, la más dulce, tierna y todos esos adjetivos lindos, juntos. Gracias por estar en mi camino, ¡los quiero!!!

Lau y Nachi, no nos hizo falta nada de tiempo para darnos cuenta que íbamos a ser grandes amigos. Lau, ya te lo dije miles de veces, pero nunca está de más: te admiro un montón. Nachi, a vos también te admiro, no te pongas celoso. Son dos grandes personas y amigos que me llevo para siempre.

Nacho S, que para mí es un crono más, otro que se hace el rudo pero todos sabemos que por adentro es un tierno.

Porque de acá me llevó un montón de cosas, me llevo gran parte de mi formación como profesional, pero además me llevo un gran grupo de amigos. De esos que son para siempre. De esos con los que sin dudas me iría a la guerra.

A mi familia, incondicionales. Mamá y papá siguiéndome a cada paso, apoyándome e incentivándome. Delfi, la hermana que si pudiera elegiría mil veces. Gracias a ellos soy quien soy, sin dudas.

A Dani, que me acompañó desde el momento en el que llevé el CV al laboratorio, pasando por cada madrugada que me esperaba para que no volviera sola, hasta el día de hoy (no sé de donde sacaste la paciencia). “Y si es que el tiempo existe yo quiero compartirlo con vos...”

A mis abuelas que cada overnight se preocupaban por cómo iba a volver y qué iba a comer. Gracias por cuidarme siempre. Y mis abuelos, que están siempre en cada valor y enseñanza que dejaron en mí.

Y como no agradecer a mis tíos y primos (los cercanos, los más lejanos, los recuperados), a TODOS, que no faltó vez que me preguntaran cómo iban las cosas y me escucharan hablar y hablar, con atención (y sin dormirse).

A Edi, Lucho y Flor, que están siempre acompañándome, que son también mi familia.

A Pame, compañera y amiga incondicional desde el principio de los principios. Gracias por estar siempre capita, en serio.

A Pau que tuvo la cruel tarea de descontracturarme, gracias, ¡eso sí que solo una amiga lo hace!!

Amigas, amigos: de toda la vida, del colegio, de la carrera, del barrio, del club... ¡Gracias a todos! Todos de alguna manera contribuyeron en esto.

Y para terminar no quiero olvidarme de agradecer al Estado que me permitió que me formara, primero como Licenciada y ahora, como Doctora. Sin ciencia no hay futuro.



# INDICE

|   |              |
|---|--------------|
| <b>INTRODUCCION GENERAL</b> .....   | <b>- 7 -</b> |
| 1. EL SISTEMA CIRCADIANO .....  | - 9 -        |
| 1.1 <i>Historia del estudio del tiempo biológico</i> .....                    | - 9 -        |
| 1.1.1 Tratando de definir el tiempo .....                                     | - 9 -        |
| 1.1.2 ¿Cómo, dónde y cuándo suceden las cosas? .....                          | - 10 -       |
| 1.1.3 El surgimiento de la cronobiología .....                                | - 12 -       |
| 1.2 <i>Características de los ritmos</i> .....                                | - 14 -       |
| 1.2.1 Parámetros de un ritmo .....  | - 14 -       |
| 1.2.2 Características de los ritmos circadianos .....                         | - 15 -       |
| 1.2.3 Sincronización del reloj biológico .....                                | - 18 -       |
| 1.3 <i>El sistema circadiano en mamíferos</i> .....                           | - 21 -       |
| 1.3.1 Organización del reloj circadiano .....                                 | - 21 -       |
| 1.3.2 Los Núcleos Supraquiasmáticos hipotalámicos .....                       | - 23 -       |
| 1.3.3 Componentes moleculares del reloj circadiano en mamíferos .....         | - 26 -       |
| 1.3.4 Relojes circadianos en tejidos periféricos .....                        | - 30 -       |
| 1.3.5 Desincronización de los ritmos circadianos .....                        | - 33 -       |
| 1.3.6 Síndrome del <i>jet-lag</i> .....                                       | - 34 -       |
| 1.4 <i>Metodología de estudio de los ritmos circadianos en roedores</i> ..... | - 36 -       |
| 1.4.1 Los actogramas .....  | - 38 -       |
| 1.4.2 Análisis de los parámetros de un ritmo circadiano .....                 | - 40 -       |
| 2. EL SISTEMA INMUNE .....  | - 45 -       |
| 2.1 <i>Organización del sistema inmune</i> .....                              | - 45 -       |
| 2.1.1 Sistema inmune innato .....   | - 46 -       |
| 2.1.2 Sistema inmune adaptativo .....   | - 49 -       |
| 2.2 <i>Factor de Necrosis Tumoral – <math>\alpha</math></i> .....             | - 50 -       |
| 2.3 <i>Endotoxinas como activadores de la respuesta inmune</i> .....          | - 55 -       |
| 3. NEURO-INMUNOLOGÍA .....  | - 57 -       |
| 3.1 <i>El surgimiento de un nuevo campo de estudio</i> .....                  | - 57 -       |

|   |      |
|---|------|
| 3.1.1 La respuesta inmune en el sistema nervioso central .....  | 58 - |
| 3.1.2 Comunicación neuroinmune .....                            | 59 - |
| 3.2 Interacciones entre el sistema inmune y el circadiano. .... | 63 - |
| 3.2.1 Ritmos en el sistema inmune.....                          | 64 - |
| 3.2.2 Efectos del sistema inmune sobre el circadiano .....      | 68 - |

**CAPÍTULO I ..... - 73 -**

|   |       |
|---|-------|
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....  | 75 -  |
| I.1 INTRODUCCIÓN.....   | 77 -  |
| I.1.1 La citoquina TNF- $\alpha$ como mediadora entre los sistemas inmune y circadiano..... | 79 -  |
| I.1.2 El modelo de estudio: inoculación aguda de dosis bajas de LPS.....                    | 81 -  |
| I.2 MATERIALES Y METODOLOGÍA.....   | 85 -  |
| I.2.1 Animales y condiciones de alojamiento.....  | 87 -  |
| I.2.2 Registro de actividad locomotora .....  | 87 -  |
| I.2.2.1 Análisis de datos de actividad locomotora.....                                      | 87 -  |
| I.2.3 Chequeo de la presencia de la mutación en los animales TNFR1 KO.....                  | 90 -  |
| I.2.3.1 Extracción de DNA a partir de tejido.....   | 90 -  |
| I.2.3.2 Confirmación de la presencia de la mutación en los animales TNFR1 KO.....           | 90 -  |
| I.2.4 Análisis de los niveles de citoquinas/quemoquinas en tejido hipotalámico .....        | 91 -  |
| I.2.4.1 Extracción de proteínas de tejido.....  | 91 -  |
| I.2.4.2 Cuantificación de citoquinas/quemoquinas por Citometría de Flujo .....              | 92 -  |
| I.2.4.3 Análisis de los datos .....   | 93 -  |
| I.2.5 Análisis de los niveles del receptor tipo 1 de TNF- $\alpha$ en NSQ .....             | 94 -  |
| I.2.5.1 Extracción de ARN de tejido.....  | 94 -  |
| I.2.5.2 PCR en Tiempo Real.....   | 95 -  |
| I.2.6 Análisis de los niveles de I cFos, PER1 y PER2 por inmunomarcación en NSQ .....       | 96 -  |
| I.2.6.1 Perfusión .....   | 96 -  |
| I.2.6.2 Inmunohistoquímica para cFos y PER1.....  | 96 -  |
| I.2.6.3 Inmunofluorescencia para PER2 .....   | 97 -  |
| I.2.6.4 Cuantificación de células positivas para cFos, PER1 y PER2.....                     | 98 -  |
| I.2.7 Análisis estadísticos utilizados .....  | 99 -  |
| I.3 RESULTADOS .....  | 101 - |
| I.3.1 Respuesta circadiana a la administración de LPS a CT15.....                           | 103 - |
| I.3.1.1 Cambio de fase del ritmo de actividad locomotora .....                              | 103 - |

|  |                |
|--|----------------|
| I.3.1.2 Activación de las células de los NSQ y NPV en respuesta al LPS .....                   | - 103 -        |
| <i>I.3.2 Componentes de la respuesta inflamatoria en NSQ y NPV .....</i>                       | <i>- 106 -</i> |
| I.3.2.1 Niveles de citoquinas/quemoquinas en los NSQ y NPV .....                               | - 106 -        |
| I.3.2.2 Niveles diarios del receptor tipo 1 de TNF- $\alpha$ en los NSQ .....                  | - 108 -        |
| <i>I.3.3 Respuesta circadiana al LPS en ratones TNFR1 KO .....</i>                             | <i>- 109 -</i> |
| I.3.3.1 Confirmación de la presencia de la mutación en los animales TNFR1 KO .....             | - 110 -        |
| I.3.3.2 Respuesta a la administración de LPS a CT15 en animales TNFR1 KO .....                 | - 111 -        |
| I.3.3.3 Activación de los NSQ y los NPV en respuesta al LPS .....                              | - 113 -        |
| I.3.3.4 Expresión de genes reloj en respuesta al estímulo inmune periférico .....              | - 115 -        |
| <i>I.3.4 Caracterización circadiana de los animales TNFR1 KO .....</i>                         | <i>- 118 -</i> |
| I.3.4.1 Patrón de actividad en condiciones de LO .....   | - 118 -        |
| I.3.4.2 Período endógeno de actividad locomotora de los ratones TNFR1 KO .....                 | - 119 -        |
| I.3.4.3 Patrón de actividad en condiciones de OO .....   | - 122 -        |
| I.3.4.4 Respuesta a los pulsos de luz .....  | - 123 -        |
| I.3.4.5 Resincronización a un nuevo ciclo de LO .....  | - 125 -        |
| I.4 RESUMEN DE RESULTADOS .....  | - 127 -        |
| I.5 DISCUSIÓN .....  | - 131 -        |
| <i>I.5.1 Respuesta circadiana al LPS .....</i>   | <i>- 133 -</i> |
| <i>I.5.2 Expresión de TNF-<math>\alpha</math> y su receptor, TNFR1, en los NSQ y NPV .....</i> | <i>- 136 -</i> |
| <i>I.5.3 Activación de los NSQ en respuesta al LPS .....</i>                                   | <i>- 138 -</i> |
| <i>I.5.4 Expresión de genes reloj en respuesta al LPS .....</i>                                | <i>- 140 -</i> |
| <i>I.5.6 Caracterización circadiana de los ratones TNFR1 KO .....</i>                          | <i>- 144 -</i> |
| I.6 CONCLUSIONES .....   | - 147 -        |
| <b>CAPÍTULO II .....</b>   | <b>- 153 -</b> |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....  | - 155 -        |
| II.1 INTRODUCCIÓN .....  | - 157 -        |
| <i>II.1.1 Sepsis y shock séptico .....</i>   | <i>- 159 -</i> |
| II.1.1.1 Breve introducción a la problemática .....  | - 159 -        |
| II.1.1.2 Características clínicas de la enfermedad .....                                       | - 160 -        |
| II.1.1.3 Respuesta inflamatoria desencadenada por la sepsis .....                              | - 162 -        |
| II.1.1.4 Rol del TNF- $\alpha$ durante la sepsis .....   | - 164 -        |
| II.1.1.5 Alteraciones de la temperatura corporal en respuesta a la sepsis .....                | - 165 -        |
| <i>II.1.2 Modelos animales para el estudio de la sepsis .....</i>                              | <i>- 166 -</i> |

|  |         |
|--|---------|
| II.1.3 Regulación nerviosa de la respuesta inflamatoria durante la sepsis .....            | - 167 - |
| II.1.4 Interacciones inmune-circadianas durante el shock séptico.....                      | - 170 - |
| II.1.4.1 Efectos de la desincronización circadiana en la respuesta septica .....           | - 171 - |
| II.2 MATERIALES Y METODOLOGÍA.....   | - 173 - |
| II.2.1 Animales y condiciones de alojamiento.....  | - 175 - |
| II.2.1.1 Protocolo experimental de desincronización circadiana .....                       | - 175 - |
| II.2.2 Diseño experimental.....  | - 176 - |
| II.2.3 Registro de la temperatura corporal .....   | - 177 - |
| II.2.4 Recolección y procesamiento de muestras.....  | - 177 - |
| II.2.4.1 Recolección de suero .....  | - 177 - |
| II.2.4.2 Extracción de proteínas de tejido.....  | - 178 - |
| II.2.4.3 Extracción de ARN de tejido y Retrotranscripción .....                            | - 178 - |
| II.2.5 Transferencia de suero.....   | - 179 - |
| II.2.6 Cuantificación de los niveles de TNF- $\alpha$ por ELISA.....                       | - 179 - |
| II.2.7 Cuantificación de citoquinas por Citometría de Flujo. ....                          | - 179 - |
| II.2.8 Cuantificación de los niveles de corticosterona en suero.....                       | - 180 - |
| II.2.9 Cuantificación de los niveles del endocanabinoide 2-AG en suero.....                | - 180 - |
| II.2.10 Cuantificación de los niveles de LPS en suero.....                                 | - 181 - |
| II.2.11 Cuantificación de los niveles de expresión de TNF- $\alpha$ y TNFR1 en tejido..... | - 182 - |
| II.2.11 PCR en Tiempo Real.....  | - 182 - |
| II.2.12 Análisis de los niveles cFos por inmunomarcación en hipotálamo.....                | - 182 - |
| II.2.12.1 Perfusiones.....   | - 182 - |
| II.2.12.2 Inmunohistoquímica para cFos.....  | - 182 - |
| II.2.12.3 Cuantificación de células positivas .....  | - 183 - |
| II.2.13 Estudio de la integridad de la BHE.....  | - 184 - |
| II.2.14 Análisis de poblaciones celulares por Citometría de Flujo .....                    | - 184 - |
| II.2.14.1 Recolección de exudado peritoneal.....   | - 184 - |
| II.2.14.2 Extracción de esplenocitos .....   | - 185 - |
| II.2.14.3 Inmunomarcación de las células y citometría de flujo.....                        | - 185 - |
| II.2.15 Estadística .....  | - 186 - |
| II.3 RESULTADOS .....  | - 187 - |
| II.3.1 Respuesta diferencial al shock endotóxico inducido a distintos horarios .....       | - 189 - |
| II.3.1.1 Diferencia diaria en la tasa de mortalidad.....                                   | - 189 - |
| II.3.1.2 Respuesta térmica diferencial inducida por LPS .....                              | - 190 - |



|  |       |
|--|-------|
| II.3.1.3 Disminución del peso corporal a causa del shock séptico .....                                     | 194 - |
| <i>II.3.2 Respuesta diferencial en el SNC</i> .....  | 195 - |
| II.3.2.1 Activación de los APO, NPV y NSQ durante el shock endotóxico .....                                | 195 - |
| II.3.2.2 Niveles de expresión de <i>Tnf-α</i> y <i>Tnfr1</i> en APO en respuesta al shock endotóxico ..... | 197 - |
| II.3.2.3 Integridad de la barrera hematoencefálica luego de la inducción del shock séptico ..              | 198 - |
| <i>II.3.3 Diferencias en la composición sérica</i> .....   | 200 - |
| II.3.3.1 Respuesta termoregulatoria luego de la inoculación con suero.....                                 | 200 - |
| II.3.3.2 Niveles de LPS en el suero de los animales estimulados.....                                       | 202 - |
| II.3.3.3 Niveles de corticosterona en suero de animales estimulados a ambos horarios.....                  | 203 - |
| II.3.3.4 Niveles del endocanabinoide 2-AG en suero de animales estimulados con LPS.....                    | 204 - |
| II.3.3.5 Niveles de citoquinas en suero de animales tratados a ambos horarios .....                        | 205 - |
| <i>II.3.4 Respuesta inflamatoria en tejidos periféricos y células peritoneales</i> .....                   | 206 - |
| II.3.4.1 Niveles de TNF-α en tejido hepático y esplénico.....  | 206 - |
| II.3.4.2 Porcentaje y nivel de activación de macrófagos en exudado peritoneal.....                         | 207 - |
| II.3.4.3 Niveles de macrófagos en bazo luego del tratamiento con LPS a ambos horarios .....                | 214 - |
| <i>II.3.5 Respuesta a las dosis altas de LPS en animales TNFR1 KO</i> .....                                | 219 - |
| II.3.5.1 Mortalidad en animales TNFR1 KO .....   | 219 - |
| II.3.5.2 Hipotermia en animales TNFR1 KO .....   | 221 - |
| <i>II.3.6 Efectos de la desincronización circadiana</i> .....  | 224 - |
| II.3.6.1 Mortalidad en animales bajo desincronización circadiana .....                                     | 224 - |
| II.3.6.2 Hipotermia en animales con desincronización circadiana .....                                      | 225 - |
| II.3.6.3 Niveles de TNF-α en suero de animales desincronizados.....  | 228 - |
| II.3.6.4 Disminución del peso corporal a causa del shock séptico .....                                     | 228 - |
| II.4 RESUMEN DE RESULTADOS .....   | 231 - |
| II.5 DISCUSIÓN.....  | 235 - |
| <i>II.5.1 Variación diaria de la mortalidad causada por el shock séptico</i> .....                         | 237 - |
| <i>II.5.2 Respuesta termoregulatoria diferencial en la sepsis</i> .....                                    | 239 - |
| II.5.2.1 Estructuras hipotalámicas activadas durante la sepsis.....  | 242 - |
| <i>II.5.2 Comunicación neuro-inmune durante la sepsis</i> .....  | 243 - |
| <i>II.5.3 Respuesta inflamatoria diferencial durante el shock séptico</i> .....                            | 245 - |
| II.5.3.1 Respuesta inflamatoria a nivel central .....  | 245 - |
| II.5.3.2 Respuesta inflamatoria a nivel periférico .....   | 246 - |
| II.5.3.3 Respuesta de macrófagos al shock séptico .....  | 250 - |
| <i>II.5.2 Efectos de la desincronización circadiana en la respuesta al shock séptico</i> .....             | 254 - |

|   |                |
|---|----------------|
| II.6 CONCLUSIONES.....  | - 257 -        |
| <b>ANEXO.....</b>   | <b>- 261 -</b> |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....  | - 263 -        |
| III.1 INTRODUCCIÓN .....  | - 265 -        |
| <i>III.1.1 Características de las reacciones de hipersensibilidad .....</i>                     | <i>- 267 -</i> |
| III.1.1.1 Patogénesis del asma: rol de TNF- $\alpha$ .....                                      | - 268 -        |
| III.1.1.2 Modelos murinos de asma bronquial .....   | - 269 -        |
| <i>III.1.2 Ritmos circadianos en la función pulmonar.....</i>                                   | <i>- 270 -</i> |
| III.1.2.1 La interacción inmune-circadiana en el asma bronquial .....                           | - 272 -        |
| III.2 MATERIALES Y METODOLOGÍA.....   | - 275 -        |
| <i>III.2.1 Animales y condiciones de alojamiento.....</i>                                       | <i>- 277 -</i> |
| <i>III.2.1.1 Registro de actividad locomotora .....</i>   | <i>- 277 -</i> |
| <i>III.2.1.2 Análisis de datos de actividad locomotora.....</i>                                 | <i>- 277 -</i> |
| <i>III.2.2 Inducción de asma alérgico.....</i>  | <i>- 278 -</i> |
| <i>III.2.3 Análisis de la histopatología pulmonar .....</i>                                     | <i>- 279 -</i> |
| <i>III.2.4 Determinación de los niveles de expresión de Tnf-<math>\alpha</math> y Ccl2.....</i> | <i>- 279 -</i> |
| III.2.4.1 Extracción de ARN de tejido y retrotranscripción.....                                 | - 279 -        |
| III.2.4.2 PCR en Tiempo Real.....   | - 279 -        |
| III.3 RESULTADOS .....  | - 281 -        |
| <i>III.3.1 Confirmación del desarrollo de la patología .....</i>                                | <i>- 283 -</i> |
| III.3.1.1 Histopatología de los pulmones.....   | - 283 -        |
| III.3.1.2 Niveles de expresión de Tnf- $\alpha$ y Ccl2, y de IL-6 en pulmón.....                | - 285 -        |
| <i>III.3.2 Expresión de citoquinas en NSQ en animales con asma bronquial .....</i>              | <i>- 285 -</i> |
| <i>III.3.3 Caracterización de la actividad locomotora general de animales con asma .....</i>    | <i>- 286 -</i> |
| III.4 DISCUSIÓN.....  | - 291 -        |
| <i>III.4.1 Desarrollo de la patología.....</i>  | <i>- 293 -</i> |
| <i>III.4.2 Niveles de mediadores inflamatorios en NSQ .....</i>                                 | <i>- 293 -</i> |
| <i>III.4.3 Análisis del patrón de actividad circadiana.....</i>                                 | <i>- 295 -</i> |
| CONCLUSIONES GENERALES.....   | - 297 -        |
| ABREVIATURAS.....   | - 303 -        |
| BIBLIOGRAFÍA .....  | - 305 -        |

# **INTRODUCCION GENERAL**



# **1. EL SISTEMA CIRCADIANO**

## **1.1 Historia del estudio del tiempo biológico**

### **1.1.1 Tratando de definir el tiempo**

A menudo nos sentimos preocupados por el tiempo: por lo rápido que pasa, por las veces que lo perdemos; así, usamos relojes y calendarios para medirlo. Sabemos que es oro y que cura todas las heridas. ¿Pero cuántas veces nos preguntamos qué es el tiempo? Quizás directamente no lo hacemos porque la respuesta a esta pregunta es muy compleja, prácticamente imposible.

Los pueblos ancestrales atribuían el tiempo a los dioses. En la mitología griega Chronos era la personificación del tiempo, y permaneció como el dios remoto e incorpóreo del tiempo que rodeaba el universo, conduciendo la rotación de los cielos y el eterno paso temporal. Para los romanos, Saturno era el emblema del tiempo. Se lo representaba como un anciano con larga barba blanca. Y fue gracias a ellos que el planeta más exterior del sistema solar adquirió el nombre de Saturno ya que, dado que tenía el mayor periodo reproducible observable del cielo, se pensaba que era el guardián del tiempo.

Los antiguos pensadores también trataron de definirlo. Según Platón (427-347 a.C.), el tiempo fue creado después del universo para perfeccionar el movimiento de los astros y lo definió como “*la imagen móvil de la eternidad*”. En la Edad Media, San Agustín también se encargó de discutir sobre el tema: “*Y en cuanto al tiempo presente, es cierto que si siempre fuera presente y no se mudara ni se fuera a ser pasado, ya no sería tiempo, sino eternidad.*” En el siglo XVIII, Newton y Kant tuvieron posturas desencontradas acerca del tema. Para Newton: “*el tiempo absoluto, verdadero y matemático, tomado por sí sólo, sin*

*relación a ningún cuerpo, transcurre de un modo uniforme correspondiente a su propia naturaleza.*”. Sin embargo, para Kant “*el tiempo es una forma pura de la sensibilidad*” y solo existe porque es una intuición del ser humano. Estas discusiones siguen hasta nuestros días, pasando por científicos como Einstein, filósofos como Henri Bergson, y poetas y cantantes que intentan definirlo en sus obras... pero aún seguimos sin poder explicar qué es el tiempo. No nos conformamos con la simple definición de que es una magnitud física con la que medimos la duración o separación de acontecimientos. Los seres humanos no percibimos el tiempo en sí mismo, lo que percibimos es el cambio, y estos cambios pueden ser cíclicos o no. Pero esta discusión la dejamos para las próximas líneas...

### **1.1.2 ¿Cómo, dónde y cuándo suceden las cosas?**

Kairos es una antigua palabra griega que significa el momento adecuado, el momento oportuno. Los griegos tenían dos palabras para referirse al tiempo: Cronos y Kairos. La primera se refiere al tiempo cronológico o secuencial, la segunda se refiere al momento oportuno cuando las cosas especiales suceden. Es que no solo importa *cómo* y *dónde* sucede algo sino que, sobre todo en biología, también importa el *cuándo*.

El poeta griego Hesíodo escribió hacia el año 700 a.C. que “las enfermedades caen sobre los hombres, algunas de día y otras por la noche”. Hipócrates aconsejaba a los interesados en medicina “investigar las estaciones del año y lo que sucede en ellas”.

Cada amanecer los sacerdotes del imperio egipcio registraban cuidadosamente el nivel de las aguas del río Nilo. El momento de la siembra y el

de la cosecha dependían de ello, y tras años de observaciones descubrieron que cada 365 días el ciclo se repetía.

Varios siglos más tarde, Andróstenes, uno de los cronistas de la expedición de Alejandro Magno, relató que las hojas y pétalos del tamarindo se movían a lo largo del día, como “saludando al sol”.

Hacia 1751, el botánico Carlos Linneo observó cómo ciertas plantas clasificadas abrían y cerraban sus flores siempre en un horario particular del día, y que esas horas variaban de una especie a otra. De este modo determinó que era posible deducir la hora aproximada en función de qué especies abrían sus flores; de esta forma constituyó lo que llamó el reloj floral (Figura 1.1).



**Figura 1.1 Reloj Floral creado por Carlos Linneo.** A partir de este puede saberse la hora (entre las 6am y las 6pm) de acuerdo a qué especie floral está abierta o cerrada.

Pero las plantas no son los únicos organismos capaces de “medir” el paso del tiempo. La mayoría de los seres vivos que habitamos el planeta hemos desarrollado, hace miles de millones de años, mecanismos que nos permitieran anticipar los cambios periódicos y previsibles del ambiente. Esto fue posible

debido a las variables externas cíclicas a las cuales estamos sometidos. En particular, el hecho de habitar un planeta que gira alrededor del sol con un período de 24 horas, imponiéndonos un ciclo de **luz-oscuridad (LO)** de dicho período, condicionó a los seres vivos a la presencia de ritmos diarios. Estos ritmos con un período cercano a las 24 horas (entre 20 y 28 horas) se denominan **circadianos**. Sin embargo, también, existen ritmos anuales o estacionales (como los observados por los egipcios), y otros con períodos más cortos, que van de los segundos a las horas (como el ritmo cardíaco y las secreciones hormonales).

A mediados del siglo XX se formalizaron los estudios en relación al *cuándo* ocurren las cosas. Es así como surgió la **Cronobiología** (cuyo prefijo proviene del griego Chronos, que ya citamos anteriormente), una ciencia joven que estudia básicamente cuándo suceden las cosas dentro de un organismo.

### **1.1.3 El surgimiento de la cronobiología**

El primer verdadero experimento cronobiológico se publicó recién en 1729. El astrónomo Jean Jacques d'Ortous de Mairan observó que las hojas de la *Mimosa púdica* que tenía en su observatorio, se mantenían extendidas durante el día y se retraían durante la noche. Para averiguar si este movimiento era solamente para un mejor aprovechamiento de la energía solar, colocó la planta dentro de un armario al que no llegaba la luz solar. Sorprendentemente (o no), observó que las hojas se seguían moviendo. Esta fue la primera evidencia de un ritmo endógeno, es decir, capaz de mantenerse en ausencia de señales temporales externas. Los ritmos observados en las plantas por Andróstenes y



Linneo, eran ritmos exógenos, ya que estaban influenciados en forma constante por una variable externa: el ciclo de luz-oscuridad.

Sin embargo, podían existir otras variables, diferentes al ciclo LO, que influenciaran los ritmos observados por De Mairan. Es por ello que en 1759, De Monceau demostró que los movimientos de las hojas en oscuridad constante no se debían a cambios en la temperatura del ambiente (Madrid 2006; Golombek 2007).

A comienzos del siglo XVII se realizaron los primeros trabajos sobre ritmos biológicos en humanos, como el de Sanctorius, que mandó a construir una balanza en la que permaneció sentado todo el día durante meses y midió sus propias variables fisiológicas. Más recientemente, en la década de 1960, Jürgen Aschoff y Rütger Wever registraron ritmos de temperatura y actividad/reposo en humanos bajo condiciones de aislamiento absoluto, y encontraron que los ciclos presentaban un período de aproximadamente 25 horas (Aschoff 1965). Como se observa en la Figura 1.2., para estos estudios los participantes se alojaban allí durante algunas semanas y se los aislaba completamente de cualquier clave temporal externa (sonidos, luz ambiental, televisión, relojes, etc).



**Figura 1.2. Refugio subterráneo utilizado por J. Aschoff y R. Wever para el estudio de los ritmos en humanos.** Los participantes se alojaban allí durante algunas semanas para el estudio del ciclo de sueño, ritmo de temperatura y de alimentación, como así también variables cognitivas. (Imagen tomada de página web del Instituto Max Planck Gesellschaft).

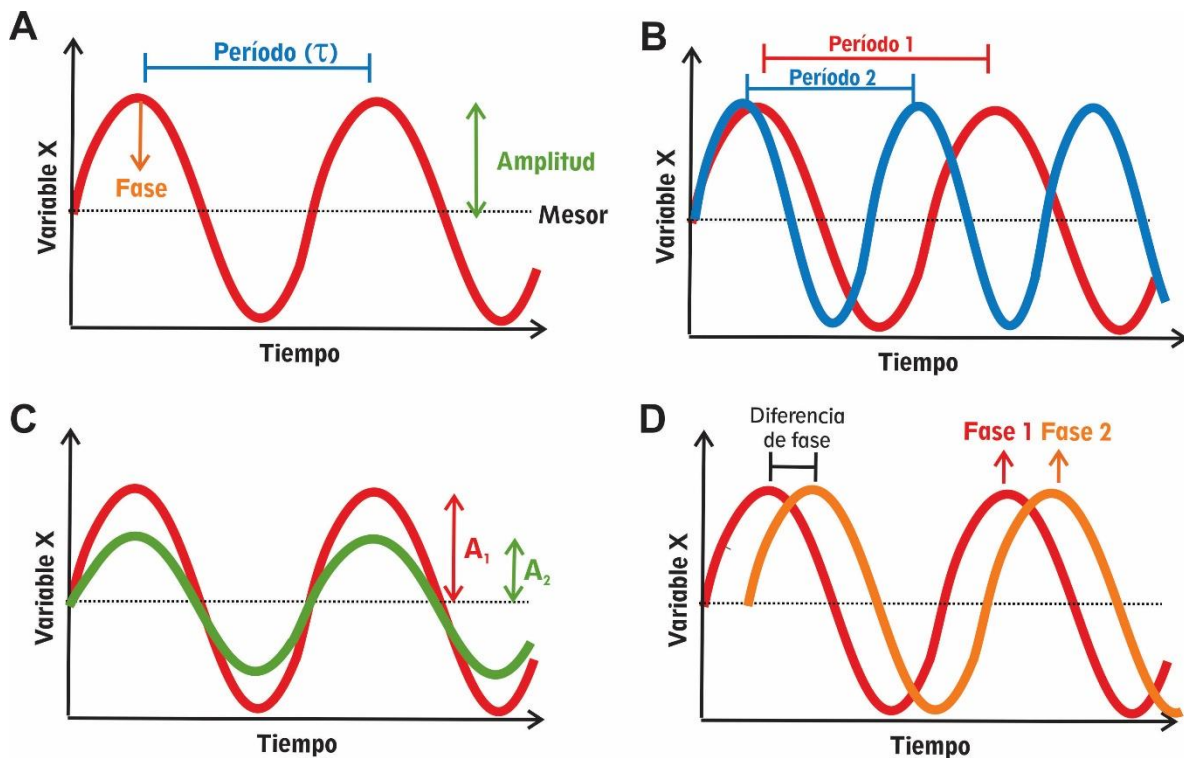
## 1.2 Características de los ritmos

### 1.2.1 Parámetros de un ritmo

Todos los ritmos, ya sean anuales, diarios, u otros, presentan las mismas propiedades; es importante describirlas antes de continuar con la caracterización de los ritmos circadianos, que son los que nos interesan en esta tesis.

Como se muestra en la Figura 1.3. A, los ritmos se grafican ajustando los datos a una función senoidal, sobre la cual se definen sus 4 parámetros fundamentales: el **Período** ( $\tau$ , tau), que es el tiempo que tarda en repetirse una oscilación completa; el **Mesor**, que es el valor medio que toma la variable a lo largo del ritmo; la **Amplitud**, que es la diferencia entre el valor máximo y el mesor; y la **Fase** ( $\Psi$ ), que corresponde al momento en que la variable adquiere un valor determinado. Se puede tomar como valor de referencia, o marcador de fase, cualquier punto del ritmo.

Estos parámetros se utilizan para comparar o estudiar alteraciones en los ritmos. En la Figura 1.3. B, se pueden observar dos ritmos con distinto período, el 2 menor que el 1. La Figura 1.3. C muestra dos oscilaciones con diferente amplitud, nuevamente la 2 menor que la 1. Por último, la Figura 1.3. D muestra dos ritmos con distinta fase. En este caso se representa un retraso de fase, ya que la fase 2 ocurre más tarde que la 1. En el sentido opuesto nos referiríamos a adelantos de fase.



**Figura 1.3. Parámetros característicos de un ritmo.** A) Representación de una oscilación de una variable rítmica a lo largo del tiempo. Se señalan los 4 parámetros de un ritmo: período, mesor, amplitud y fase. B) Se muestran dos oscilaciones con distinto período. C) Se muestran dos oscilaciones con distinta amplitud. D) Se muestran dos oscilaciones con fases diferentes. Como marcador de fase se puede utilizar cualquier punto del ritmo.

### 1.2.2 Características de los ritmos circadianos

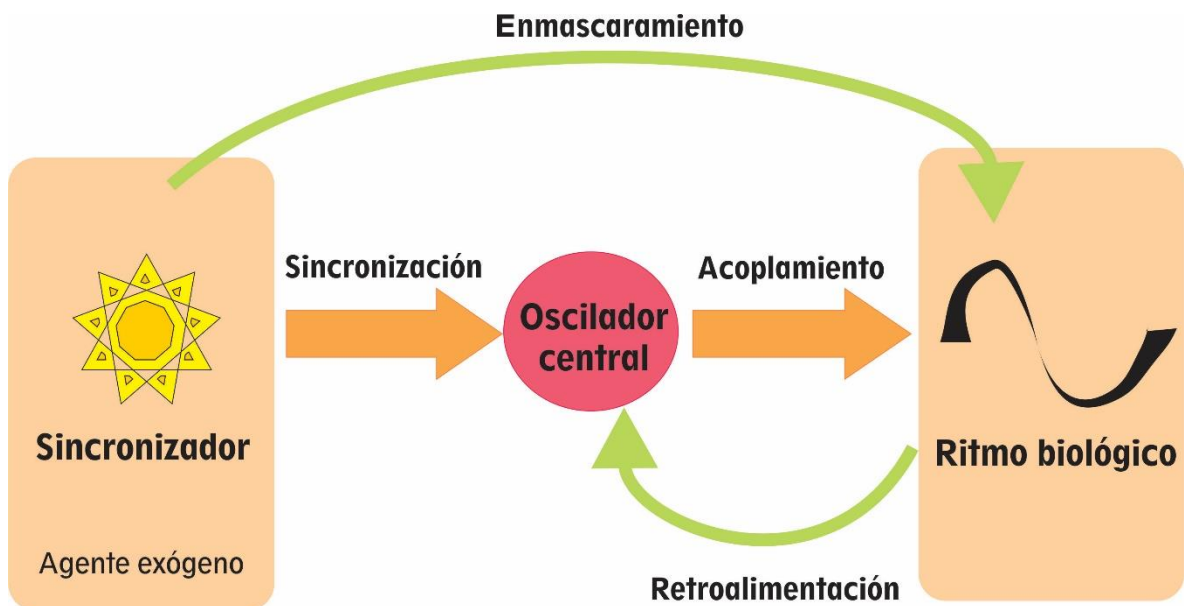
Como ya se mencionó, los ritmos circadianos son aquellos con un período cercano a las 24 horas. A pesar de las grandes distancias a nivel evolutivo, organismos como cianobacterias, algas, hongos y dinoflagelados presentan ritmos circadianos (Dunlap 1999). Anteriormente hablamos de ritmos con carácter exógeno, es decir, que son consecuencia directa de cambios en variables externas, diferenciándolos de los ritmos endógenos, que son aquellos que se mantienen en ausencia de dichas claves ambientales. Estos últimos son generados por una estructura denominada “reloj circadiano central” que está presente en la mayoría de los seres vivos. Este reloj actúa como un marcapasos,

ya que es capaz de generar oscilaciones espontáneas en forma autónoma, y transmitir las al resto del organismo, para que éste funcione organizadamente.

El carácter endógeno de los ritmos circadianos es una de sus características principales, mediante la cual mantienen sus oscilaciones aun en condiciones constantes, también llamadas de libre curso (como el armario donde colocó la planta De Mairan), donde carecen de claves temporales externas. Si por el contrario, al hacer las mediciones en condiciones constantes los ritmos desaparecen, se trata de ritmos exógenos, que necesitan de un agente dador de tiempo, denominado **zeitgeber** (del alemán zeit=tiempo, geber=dador), para poder expresarse.

Adicionalmente, este *zeitgeber* es también responsable de sincronizar al oscilador endógeno, o **reloj circadiano central**, al ciclo ambiental. Este sincronizador externo pone en “hora” todos los días a los ritmos circadianos. De esta manera, se crea un esquema lineal que representa los componentes de estos ritmos: el entrenamiento o “sincronización” del oscilador central (componente endógeno) dado por el medio ambiente (componente exógeno) da lugar a la ritmicidad en las funciones corporales (ritmos biológicos) en un proceso denominado “acoplamiento”, como el ciclo de sueño-vigilia, el ritmo en el comportamiento alimentario o en la temperatura corporal. Este esquema, muchas veces denominado “eskinograma” (debido a que fue popularizado por el científico Arnold Eskin) se puede observar en la Figura 1.4. A su vez, estos componentes interactúan entre sí de manera bidireccional, haciendo que este esquema no sea lineal. Diferentes variables corporales rítmicas son capaces de “retroalimentar” la actividad del reloj central, lo que posiblemente sirve para poner en hora más finamente el oscilador. Por otro lado, los estímulos externos pueden

afectar directamente a los ritmos biológicos, en un proceso denominado “enmascaramiento”. Por ejemplo, la actividad locomotora de los animales nocturnos puede ser afectada por el encendido de las luces durante la noche, sin llegar a sincronizar el reloj central.



**Figura 1.4 Esquema simplificado del sistema circadiano (Eskinograma).** Modelo lineal que incluye los componentes del sistema. El oscilador o reloj central endógeno es modificado por un agente exógeno sincronizador, en un proceso denominado sincronización. Esto da lugar a la generación de los ritmos biológicos, a través del mecanismo de acoplamiento. Asimismo, el sincronizador puede actuar directamente sobre la variable de salida, sin pasar por el oscilador (enmascaramiento); y esta última alterar al oscilador mediante el proceso de retroalimentación.

Otra característica del reloj circadiano es que exhibe compensación a cambios en la temperatura, esto implica que es capaz de mantener las oscilaciones adecuadas tanto en ambientes fríos como cálidos (Pittendrigh 1954).

Con estos datos, podemos definir las tres características fundamentales que poseen los ritmos circadianos:

- Presentan carácter endógeno.
- Poseen capacidad de sincronización.
- Pueden compensar los cambios de temperatura.

Las primeras dos características permiten entender el funcionamiento e importancia del sistema circadiano, posibilitando su sincronización con el medio ambiente. Esta sincronización permite, la organización temporal entre la conducta del organismo y el medio ambiente. Adicionalmente, permite la anticipación a los cambios del medio ambiente, para que los organismos se encuentren preparados para los acontecimientos que en el ocurren.

En cuanto a la tercera propiedad del reloj circadiano, como ya mencionamos, permite que los ritmos biológicos no se vean alterados ante cambios de temperatura. En fisiología la variación de un proceso respecto de la temperatura se mide utilizando la variable  $Q_{10}$ , que es igual a uno si el proceso presenta independencia de la temperatura. Los ritmos circadianos tienen un valor de  $Q_{10}$  de 0,8 a 1,4. Sin embargo, cambios diarios de temperatura pueden modificar la fase del ritmo circadiano, permitiendo que se ajuste mejor a la transición día-noche (Dunlap J.C. 2003).

### **1.2.3 Sincronización del reloj biológico**

El proceso de sincronización hace que el reloj biológico endógeno mantenga una relación de fase constante con el ciclo ambiental. De esta manera, los organismos pueden “prepararse”, anticipándose a lo que va a ocurrir en su entorno, lo que le tiene un alto valor adaptativo. Por ejemplo, un animal nocturno puede anticipar cuando aún hay luz en el ambiente, y no salir de su refugio,

evitando el riesgo de exponerse a predadores diurnos. Sin embargo, ante la posibilidad de que el animal salga de su refugio en un horario equivocado, es de utilidad que este reloj se ajuste (o “ponga en hora”), a través del proceso de sincronización, de manera de evitar futuros errores en la anticipación del ciclo ambiental.

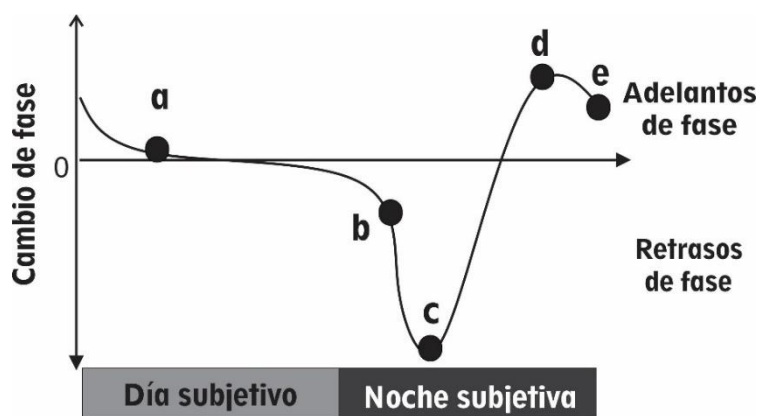
En cronobiología, existen dos tipos de sincronización: la de tipo fótica (en respuesta a la luz) y la no fótica. Dentro de la sincronización fótica se postulan dos formas diferentes de acción de la luz sobre el reloj biológico central: a través de efectos discretos o fásicos, que son los ejercidos por pulsos cortos de luz; o de efectos continuos o tónicos, que se dan cuando la presencia del ciclo de luz es constante (Pittendrigh 1981; Ruis 1991).

Los pulsos de luz cortos dan lugar a la sincronización no paramétrica: un organismo que se encuentra en condiciones constantes, exhibiendo su ritmo endógeno, puede ser sincronizado cuando es sometido a estos estímulos. El sistema circadiano no es igualmente sensible a la luz a cualquier hora del día (Czeisler 1989), de modo que estos pulsos pueden generar cambios de fase en cualquiera de los dos sentidos (retraso o adelanto), o pueden no tener efecto sobre el ritmo.

A fin de explicar más profundamente los efectos de la luz, u otro *zeitgeber*, sobre el reloj central es importante definir el concepto de **día** y **noche subjetivos**. En condiciones ambientales constantes, como la oscuridad constante, se definen el “día” y la “noche” utilizando alguna característica del ritmo en cuestión. En animales nocturnos, como los ratones que estudiaremos en esta tesis, se utiliza la actividad locomotora. Así, la noche subjetiva es la etapa

de actividad de los animales, mientras que el día subjetivo es la etapa de reposo (se explicará en mayor detalle en la sección 1.4.2).

Volviendo a los efectos de la luz, los pulsos de luz administrados en la primera parte de la noche subjetiva provocan retrasos de fase, en tanto que si se administran en las últimas horas de la noche subjetiva provocan adelantos de fase. Por el contrario, si estos pulsos son administrados durante el día subjetivo (etapa de reposo del animal nocturno) no tienen efecto alguno sobre el ritmo. Estos efectos se resumen en una Curva de Respuesta de Fase (CRF), que muestra cómo se afecta la fase del reloj ante estímulos administrados en distintos momentos del ciclo circadiano. La CRF a la luz, que se muestra en la Figura 1.5, indica los horarios (eje X del gráfico) en los que la luz puede inducir cambios en la fase circadiana (eje Y: adelantos de fase se grafican con valores positivos y retrasos con valores negativos). La CRF es una propiedad intrínseca del oscilador circadiano y su forma final es característica de cada estímulo y cada especie, inclusive la humana (Minors 1991; Golombek & Rosenstein 2010).



**Figura 1.5 Curva de respuesta de fase fótica.** Curva que muestra el cambio de fase de la oscilación en respuesta a pulsos cortos de luz administrados en distintos momentos del ciclo circadiano. Por encima del 0 en el eje X se grafican los adelantos, mientras que por debajo se grafican los retrasos de fase. En el punto a no hay cambio de fase, en los puntos b y c se observan retrasos en la fase; y los puntos d y e muestran adelantos en la fase.



Por otro lado, los efectos continuos de la luz producen sincronización paramétrica, la cual se da en organismos que están sincronizados al ciclo LO de su ambiente natural (o incluso en condiciones de luz constante). De este modo la sincronización se produce a través de la acción continua del *zeitgeber*, que en este caso no altera la fase sino el período de la oscilación (Ruis 1991).

Como se menciona previamente, la luz no es el único sincronizador de los ritmos biológicos, dado que cualquier ciclo ambiental puede actuar como *zeitgeber*, siempre que la especie sea sensible a él. Se ha comprobado que los ciclos de temperatura, de alteraciones mecánicas (como ciclos de mareas), de acción de drogas, de disponibilidad de alimentos, y contactos sociales, son buenos sincronizadores de tipo no fótico (Golombek & Rosenstein 2010). A diferencia de los estímulos fóticos, los estímulos no fóticos provocan adelantos de fase durante el día subjetivo, obteniéndose una CRF No Fótica. Dentro de estos estímulos se encuentran la presentación de una nueva rueda giratoria, el cambio de jaula o la administración de benzodiazepinas, entre otros compuestos (Edmonds 1977; Hastings 1997).

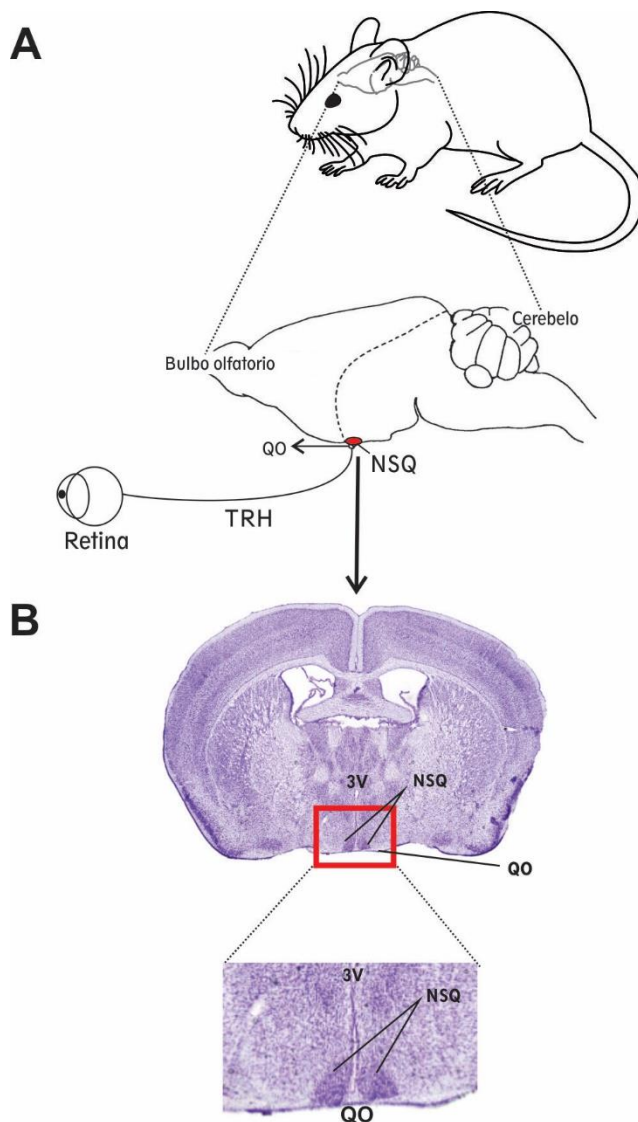
### **1.3 El sistema circadiano en mamíferos**

#### **1.3.1 Organización del reloj circadiano**

A partir del descubrimiento sobre la existencia de los ritmos circadianos y sus características, los fisiólogos comenzaron a interesarse en la localización de este oscilador endógeno. En 1971, Robert Moore inyectó un trazador marcado en la retina de ratas y encontró una vía directa desde la retina hasta el hipotálamo (tracto retinohipotalámico – TRH), que finaliza en dos pequeños núcleos que se encuentran por encima del quiasma óptico, denominados **Núcleos**

**Supraquiasmáticos (NSQ)** (NSQ, ver ubicación en la Figura 1.6) (Moore & Lenn 1972).

Luego lesionó específicamente estos núcleos y observó que los animales perdían ritmicidad en los niveles séricos de corticoesterona (Moore & Eichler 1972). Adicionalmente, Stephan y Zucker lesionaron los NSQ de ratas y descubrieron que se perdían los ritmos de bebida y actividad locomotora (Stephan & Zucker 1972).



**Figura 1.6 Localización de los Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ) hipotalámicos.** **A.** Ubicación de los NSQ en el ratón (marcados en rojo). Como se observa en la vista lateral del cerebro de ratón, se encuentran al final del tracto retinohipotalámico (TRH) y por encima del quiasma óptico (QO), en la región del hipotálamo. **B.** Corte coronal de cerebro con tinción de Nissl, a la altura de la ubicación de los NSQ (recuadro rojo). También se muestra una ampliación de los NSQ. 3V: tercer ventrículo.

Experimentos más recientes realizados con roedores arrítmicos, debido a lesiones de los NSQ o a la deficiencia de algunos de los genes involucrados en el mecanismo molecular del reloj circadiano (sección 1.3.3), demostraron que el trasplante de tejido fetal de NSQ restaura su ritmicidad circadiana (Lehman 1987; Sujino 2003). Además, en estos mismos experimentos se observó que el período de las oscilaciones luego del trasplante está determinado por la constitución genética del donante. Por lo tanto, se sugiere que las células que constituyen los NSQ son capaces de generar ritmos circadianos en forma autónoma.

A raíz de experimentos con animales lesionados, De Coursey y colaboradores quisieron estudiar las ventajas adaptativas reales de tener un reloj circadiano y liberaron ardillas con los NSQ lesionados a un entorno natural controlado. Observaron que estas ardillas tuvieron un comportamiento arrítmico, a diferencia de sus controles no lesionados que eran diurnos; y que el 60% de estos animales fue sorprendido por la aparición de predadores nocturnos (DeCoursey 1997). De esta forma se demostró que el reloj circadiano aporta la ventaja adaptativa de anticiparse a los cambios ambientales (en este caso la presencia de predadores nocturnos).

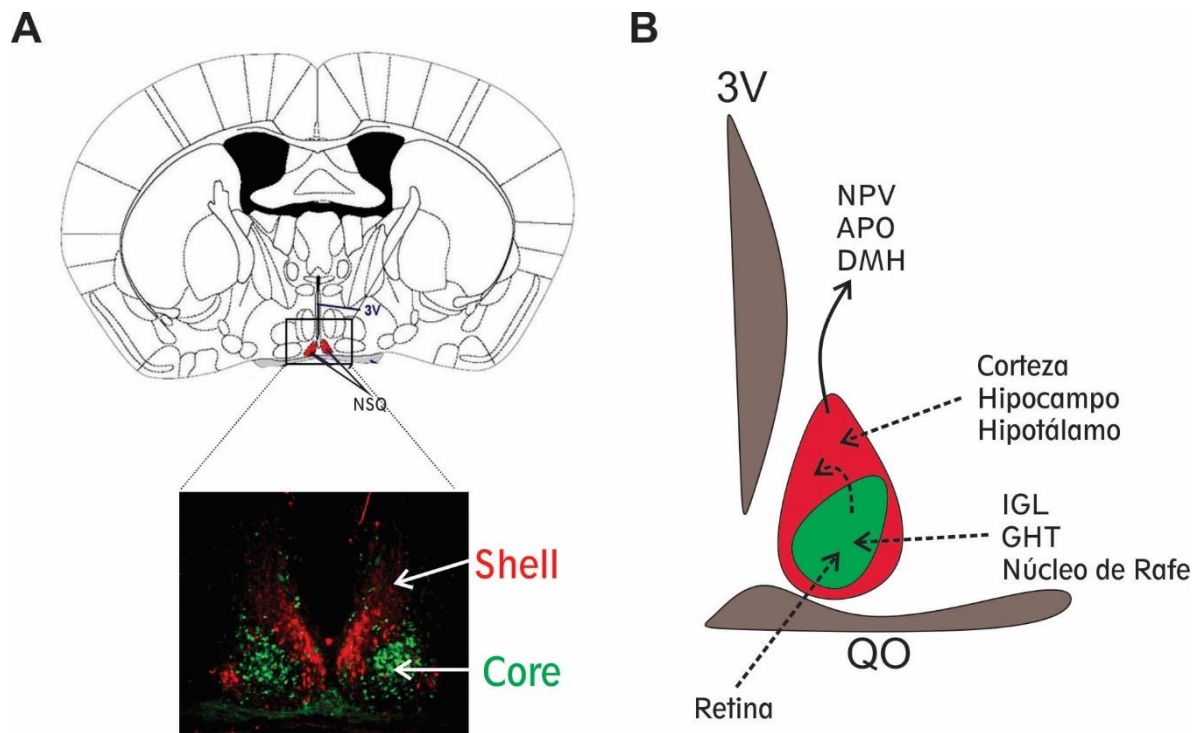
### **1.3.2 Los Núcleos Supraquiasmáticos hipotalámicos**

Los NSQ son un par de estructuras neuronales localizadas en la parte anteroventral del hipotálamo, a cada lado del tercer ventrículo, por encima del quiasma óptico, como se mostró previamente en la Figura 1.6. En el ratón, cada NSQ contiene aproximadamente 10.000 neuronas, pequeñas y densamente empaquetadas junto con otras células de sostén como las células de la glía. Esta alta densidad neuronal permite identificar fácilmente estos núcleos en cortes

histológicos de hipotálamo (ver Figura 1.6 B). Las neuronas de los NSQ son osciladores autónomos, es decir que son capaces de generar oscilaciones circadianas en forma independiente (Welsh 1995). Estructuralmente se pueden encontrar dos subdivisiones anatómicas en cada NSQ, que se diferencian citoquímicamente: la región dorsomedial (DM) o **Shell** y la región ventrolateral (VL) o **Core**. La zona del **Core** posee una alta densidad celular y recibe aferencias directas desde la retina a través del TRH, aferencias visuales secundarias desde la hojuela intergeniculada (IGL) y del tracto geniculohipotalámico (GHT), como así también del núcleo de Rafe. Por su parte, la región **Shell** envuelve parcialmente la región del **Core** y recibe sus aferencias, como así también las de la corteza cerebral, hipocampo y otras regiones hipotalámicas (Kriegsfeld 2004; Yan 2007). Estas observaciones apoyan la idea de que el **Core** recibe principalmente señales de tipo fóticas críticas para la sincronización del reloj al ciclo de luz-oscuridad (desde la retina), mientras que **Shell** recibe las proyecciones del **Core** junto con aferencias no fóticas de tipo modulatorias. Las neuronas del **Shell** serían moduladas por dichas aferencias y, por lo tanto, responsables de regular autónomamente las salidas del reloj de acuerdo a las señales recibidas (Figura 1.7 B).

Como se mencionó anteriormente, la neuronas del **Shell** envían proyecciones hacia otras zonas del hipotálamo, como los núcleos paraventriculares (NPV), el área preóptica (APO) y el hipotálamo dorsomedial (DMH). Estas zonas son áreas involucradas en el control endócrino, inmune, termorregulatorio y autonómico; y regularían los ritmos de los tejidos periféricos actuando como vías de salida del reloj central (Kalsbeek 2006). En este trabajo se estudiarán estas áreas hipotalámicas ya que resulta de particular interés

analizar su activación ante estímulos capaces de alterar el reloj circadiano, como así también en situaciones en las que el reloj se activa diferencialmente según el horario en el que se administra este estímulo.



**Figura 1.7 Características neuroanatómicas de los NSQ.** **A.** Sección coronal de NSQ de ratón. En rojo se observan las células positivas para AVP de *Shell*, y en verde las células positivas para GRP del *Core* de los NSQ. Imagen modificada de (Karatsoreos 2004). **B.** Esquema de la disposición de ambas zonas en el NSQ derecho. Las flechas de línea punteada indican las aferencias hacia ambas zonas; mientras que las de línea continua indican las eferencias. QO: quiasma óptico. IGL: Hojuela Intergeniculada. GHT: tracto geniculohipotalámico. NPV: núcleo paraventricular. APO: área preóptica. DMH: hipotálamo dorsomedial.

Las neuronas de cada subregión se distinguen por su contenido neuroquímico diferencial. La mayoría de las neuronas del *Core* contienen péptido intestinal vasoactivo (VIP), mientras que una proporción menor contiene péptido liberador de gastrina (GRP), neurotensina (NT) y calretinina (CALR). Dentro de la región *Shell*, las neuronas contienen arginina vasopresina (AVP), calbindina

(CALB), angiotensina II (AII) y met-enkefalina (Abrahamson & Moore 2001). En la Figura 1.7 A, se observan las dos regiones de los NSQ, de acuerdo con su inmunoreactividad para AVP y GRP.

Adicionalmente, en la mayoría de las neuronas de los NSQ los neuropéptidos co-localizan con el neurotransmisor ácido gamma amino butírico (GABA; (Moore & Speh 1993; Hermes 1996)). Por lo tanto, este neurotransmisor podría actuar comunicando estas dos regiones de los NSQ. Otros candidatos que podrían mediar la comunicación entre las dos regiones son el VIP y el óxido nítrico (NO) (Hastings & Herzog 2004; Plano 2007).

Otra característica de los NSQ de mamíferos es la gran abundancia de células gliales que presentan, específicamente de astrocitos, los cuales se caracterizan por la expresión de la proteína acídica fibrilar glial (GFAP). Experimentos recientes demostraron que esta proteína posee un claro ritmo diario y circadiano en los NSQ (Leone 2006). Asimismo, Brancaccio y colaboradores, han observado que, en ausencia del reloj molecular de otras células (como las neuronas), el reloj autónomo de los astrocitos puede dirigir las oscilaciones moleculares dentro de los NSQ y dar lugar a los comportamientos circadianos, a través de la sincronización neuronal por vía glutamatérgica (Brancaccio 2019).

### **1.3.3 Componentes moleculares del reloj circadiano en mamíferos**

La naturaleza autónoma de las células de los NSQ estimuló el estudio de los procesos celulares y moleculares que participan en el mecanismo del reloj. Sus componentes centrales son genes cuyos productos proteicos son necesarios para la generación y regulación autónoma de los ritmos circadianos

(Ko & Takahashi 2006). Hacia 1988 la aparición de un hámster con una mutación espontánea que le reducía el período de actividad locomotora en 4 horas (Ralph & Menaker 1988), inspiró a los investigadores al uso de la genética directa como principal herramienta para el estudio del reloj molecular circadiano.

De esta forma, el grupo de Joseph Takahashi obtuvo un animal cuyo período era más largo de lo normal, y al mapear su genoma encontraron que presentaba afectado un gen al que luego se denominó *Clock* (*circadian locomotor output cycles kaput*) (Vitaterna 1994). Esta estrategia ya había sido utilizada en otros organismos, como en la mosca *Drosophila melanogaster* (Rosbash & Hall 1989; Young 1996), tarea que le valió el premio nobel de Medicina 2017 al grupo de científicos compuesto por Michael Rosbash, Jeffrey Hall y Michael Young, por “sus descubrimientos sobre los mecanismos moleculares que controlan el reloj circadiano”.

Utilizando experimentos similares, y teniendo en cuenta que los mecanismos moleculares del reloj son muy similares en diferentes organismos (lo que permitió la búsqueda de genes homólogos), se descubrieron los demás genes reloj.

En la actualidad se sabe que el reloj molecular está compuesto por bucles de retroalimentación transcripcionales y traduccionales positivos y negativos (Figura 1.8). En el bucle de retroalimentación principal, participan factores de transcripción de la familia (bHLH)-PAS (*basic hélix-loop-hélix – Period Arnt Single-minded*), que son el gen **Clock** y otro gen llamado **Bmal1** (*Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like 1*). Los productos proteicos de estos genes heterodimerizan e inician la transcripción de genes que contienen la secuencia regulatoria E-box; entre ellos se incluyen los

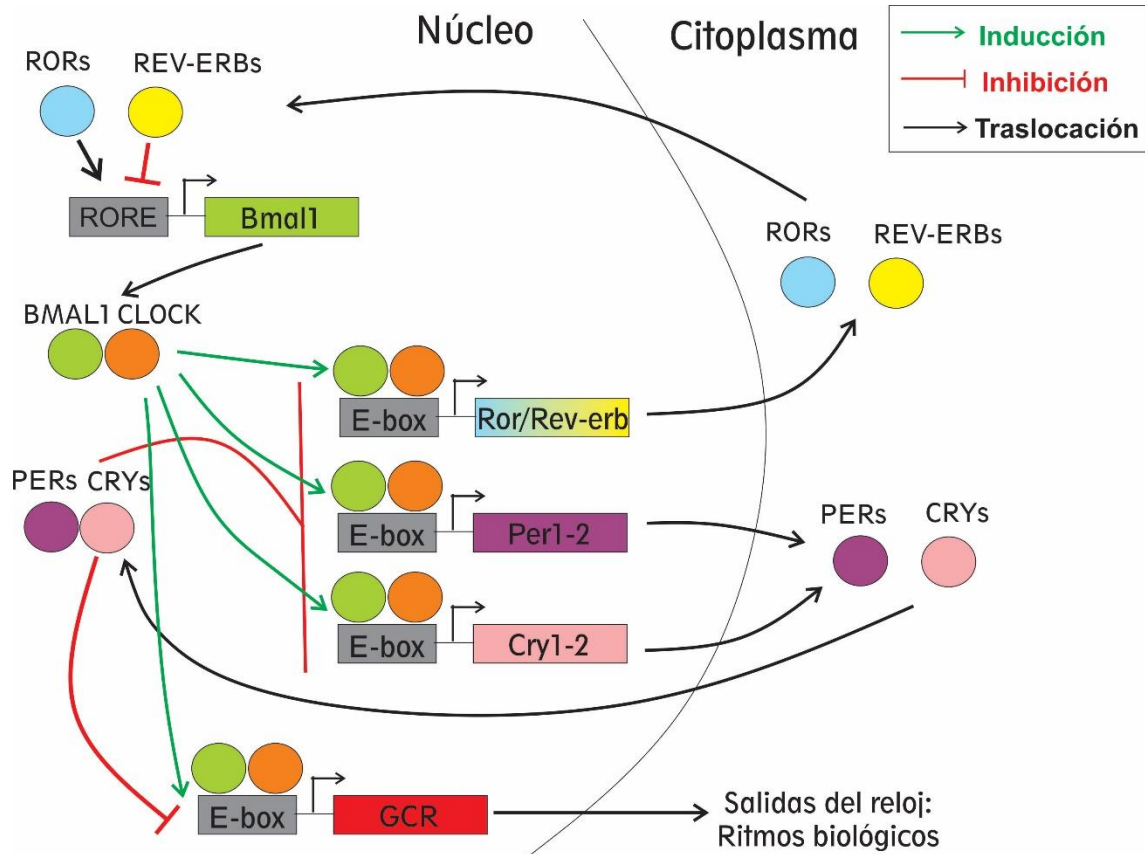
genes ***Period (Per) 1, 2 y 3***, ***Cryptochrome (Cry) 1 y 2***, *Rev-erb $\alpha/\beta$*  y *Ror $\alpha/\beta/\gamma$* , además de los genes controlados por el reloj (GCR). El bucle de retroalimentación negativo es llevado a cabo por el heterodímero formado por la proteínas PER y CRY, las cuales se traslocan al núcleo, heterodimerizan, e interaccionan con el heterodímero CLOCK-BMAL1, inhibiendo su actividad. De esta forma también inhiben su propia transcripción y la de los GCR. Por su parte, los GCR no participan del mecanismo de oscilación sino de la generación de los ritmos biológicos propiamente dichos, ya que sus productos son las salidas del reloj (Ko & Takahashi 2006; Partch 2014).

El heterodímero CLOCK-BMAL1 genera otro bucle de retroalimentación, en el cual participan los receptores nucleares relacionados al ácido retinoico, *Rev-Erba* y *Ror $\alpha$* . Las proteínas codificadas por estos genes compiten para unirse a los elementos de respuesta *Rore*, presentes en el promotor de *Bmal1*, y de esta forma activar o inhibir su transcripción, respectivamente. Estas proteínas, por lo tanto, regulan la expresión de *Bmal1* (Ko & Takahashi 2006; Partch 2014).

Los bucles de retroalimentación tardan aproximadamente 24 horas en completar un ciclo, por lo que constituyen un reloj molecular circadiano autónomo. Adicionalmente, este mecanismo está regulado, además, por modificaciones post-transcripcionales, como fosforilaciones y ubiquitinaciones. Las primeras son llevadas a cabo por las caseína quinasas 1 epsilon y 1 delta (CK1 $\epsilon$  y CK1 $\delta$ ), las cuales se encargan de la fosforilación de PER y CRY, para acelerar su traslocación al núcleo o favorecer su degradación por ubiquitinación. Estos procesos contribuyen a la precisión del reloj circadiano (Akashi 2002; Eide 2002; Eide 2005). Mutaciones en CK1 $\epsilon$  y CK1 $\delta$ , pueden causar períodos



circadianos más cortos en mamíferos (Lowrey 2000; Xu 2005). Recientemente, se encontró otra pequeña ubiquitina que puede modificar BMAL1 a nivel post-traducciona (Cardone 2005).



**Figura 1.8 Componentes moleculares del reloj circadiano de mamíferos.** El bucle de retroalimentación principal es llevado a cabo por las proteínas CLOCK y BMAL1. Estas proteínas heterodimerizan e inician la transcripción de los genes *Period (Per)* 1, 2 y 3, y *Cryptochrome (Cry)* 1 y 2, además de otros genes controlados por el reloj (GCR). El bucle de retroalimentación negativo es llevado a cabo por el heterodímero formado por PER 1 o 2 y CRY 1 o 2, que se traslocan al núcleo, heterodimerizan, e inhiben su propia transcripción y la de otros genes con región E-box, uniéndose al heterodímero CLOCK-BMAL1. Además, el heterodímero CLOCK-BMAL1 activan la transcripción de los receptores nucleares ROR y REV-ERB, que se unen a la secuencia Rore, y activan o inhiben la transcripción de *Bmal1*. Las líneas rojas representan mecanismos de represión, mientras que las verdes de inducción, y las negras de traslocación.

Todos estos mecanismos llevan a que exista ritmicidad en la expresión de los genes reloj. Los niveles de ARNm y de proteína de PER 1, 2 y 3, CRY 1 y 2, ROR $\alpha$  y REV-ERB $\alpha$  en NSQ de roedores nocturnos poseen su máximo durante el día, mientras que los niveles de BMAL1 poseen su máximo durante la noche, es decir, que se encuentran en antifase. En cambio, los niveles de CLOCK no oscilan en NSQ (Abe 1998; Asai 2001; Lowrey & Takahashi 2004; Chun 2015; Oishi 2015).

Como se viene mencionando, la información fótica llega a los NSQ a través del TRH, desde donde se proyectan los axones de células ganglionares fotosensibles de la retina, las cuales secretan el neurotransmisor glutamato. Este neurotransmisor provoca la despolarización de la membrana, que lleva al ingreso de un flujo de calcio, que a su vez activa un complejo de quinasas (CaMK, MAPK, PKA). Estas quinasas fosforilan la proteína de unión a CRE (elemento de respuesta a Calcio/AMPC), denominada CREB, la cual se activa e induce la expresión de los genes que poseen dicho elemento (Golombek 2003). Algunos de estos genes son *Per1*, *Per2* y el gen de activación neuronal inmediatamente temprano, *cFos* (Beaule & Amir 1999; Yan & Okamura 2002). La inducción de *Per1* es relacionada generalmente con los avances de la fase, mientras que la de *Per2* con los retrasos (Yan & Okamura 2002). La inducción de *Per1* en respuesta a la luz es muy rápida, ya que se puede observar un incremento en los niveles de ARNm a los 10 minutos del pulso de luz y mostrando un pico máximo de expresión 1 hora después de dicho estímulo.

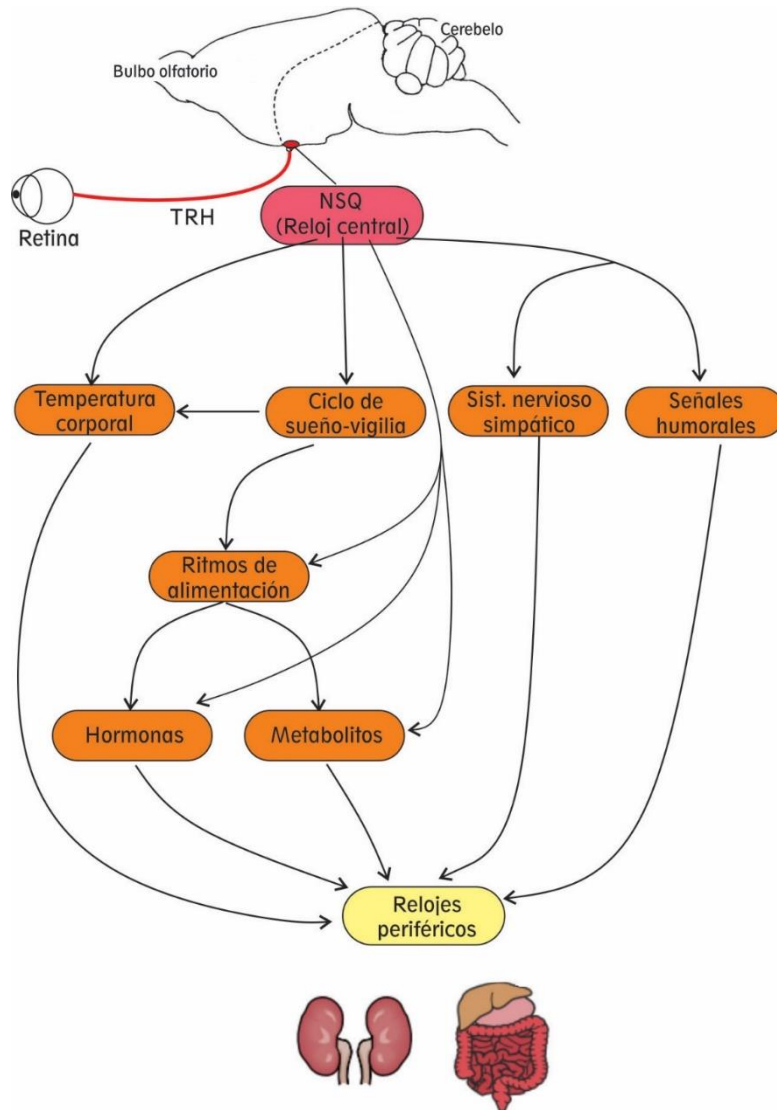
#### **1.3.4 Relojes circadianos en tejidos periféricos**

El descubrimiento de la existencia de los genes reloj llevó a pensar que este mecanismo podía replicarse en todas las células del organismo. Para

comprobar esta hipótesis se realizaron diferentes estudios, utilizando genes reporteros y otras técnicas que demostraron que prácticamente todas las células del organismo contienen un reloj molecular circadiano (Balsalobre 1998; Nagoshi 2004; Welsh 2004; Yoo 2004).

Para que estos relojes periféricos sean efectivos, deben poder sincronizarse a las señales ambientales. Esta función la cumple el reloj central ubicado en los NSQ, el cual “controla” a los osciladores periféricos. Ha sido observado que la pérdida de los NSQ resulta en la desincronización de los relojes periféricos (Yoo 2004).

Esto sugiere que la luz percibida por las células ganglionares de la retina genera una señal que es enviada a los NSQ, y que luego estos núcleos señalan a los osciladores periféricos para controlar la fisiología circadiana. Estas señales pueden ser enviadas por distintas vías. Por ejemplo, se demostró que los ritmos de alimentación o de temperatura pueden ser agentes sincronizadores de los relojes periféricos (Damiola 2000; Brown 2002). Pero, además, los NSQ utilizan señales humorales y neurales para controlar la fase de los osciladores periféricos. Entre los humorales podemos mencionar el ritmo de secreción de glucocorticoides, hormona que afecta la sincronización de distintos tejidos periféricos (Balsalobre 2000). Por su lado, entre los neuronales podemos mencionar la señalización a través del sistema nervioso autónomo (Buijs 2001; Cailotto 2009). En la Figura 1.9 se observa el esquema simplificado de sincronización de los relojes periféricos.



**Figura 1.9 Sincronización de los relojes periféricos.** Los NSQ se sincronizan al ciclo LO ambiental a partir de la información que reciben a través del TRH. Los tejidos periféricos reciben claves temporales de los NSQ a través de señales directas desde el sistema nervioso autónomo o por vía endócrina. Por otro lado, los ritmos de temperatura corporal y de alimentación, afectados también por el ciclo de sueño-vigilia, sirven como señales sincronizadoras de los relojes periféricos. Modificado de (Dibner 2010).

En resumen, el sistema circadiano de los mamíferos comprende cuatro elementos básicos:

- Un marcapasos o reloj central, ubicado en los NSQ, donde se generan oscilatorias espontáneas.
- Osciladores periféricos (sistemas efectores), controlados por el reloj central, y vías de salida desde los NSQ hacia dichos osciladores, necesarias para la expresión de los ritmos.
- Vías de entrada para la información fótica, como el TRH, que llevan la información lumínica al reloj y lo sincronizan al ciclo LO ambiental.
- Vías de entrada para la información de tipo no-fótica, que llevan al reloj información “especial” (estado de alerta, aumento de la actividad, factores endocrinos y neurotransmisores), y que también son capaces de sincronizar a los NSQ, y en condiciones de sincronización normal por luz constituyen vías modulatorias.

### **1.3.5 Desincronización de los ritmos circadianos**

Para un buen funcionamiento de todos los procesos fisiológicos del organismo es importante que se mantenga la sincronización entre el reloj central, los relojes periféricos y el ciclo ambiental. Como ya mencionamos, la sincronización entre el reloj central y los relojes periféricos se refuerza a través de los ritmos de secreción hormonal, de temperatura corporal y de alimentación. Además, otros factores como la actividad física y la interacción social pueden actuar como estímulos sincronizadores, por eso es importante que se presenten en el momento adecuado (Cambras 2012; Hower 2018).

Sin embargo, existen situaciones en las que se alteran las condiciones de sincronización normales. Estas alteraciones pueden deberse a la imposibilidad de procesar la información del ciclo LO ambiental, como se puede dar en situaciones de ceguera; o por conflictos entre la fase del reloj endógeno y el ciclo ambiental. Este último puede darse por alteraciones endógenas, como pueden ser desórdenes genéticos en el reloj circadiano, o por alteraciones exógenas, dadas por cambios en el ciclo de LO (como el *jet-lag* causado por viajes transmeridianos) o por cambios en el ciclo de sueño-vigilia (como en el caso del trabajo en turnos rotativos).

### **1.3.6 Síndrome del *jet-lag***

El término *jet lag* se refiere a una serie de perturbaciones psicológicas y fisiológicas que se desarrollan cuando los ritmos circadianos internos y el tiempo externo no están sincronizados. Este síndrome es experimentado por aquellos que realizan viajes transmeridianos, donde el ciclo de LO ambiental se adelanta o retrasa con respecto al reloj circadiano del individuo. Se caracteriza por una disminución en el estado de alerta, insomnio, bajo rendimiento, pérdida de apetito, depresión y problemas gastrointestinales (Arendt & Marks 1982). Luego del viaje, los ritmos biológicos se resincronizan gradualmente con el nuevo *zeitgeber*, pero la velocidad de ajuste del reloj circadiano es limitada por lo cual demora varios días al adaptarse al nuevo ciclo LO. Es de esperar que la adaptación sea más rápida al producirse un retraso de fase del ciclo LO (vuelos en dirección Oeste) debido a que el reloj circadiano humano posee un período endógeno de aproximadamente 25 horas, por lo cual tiene una tendencia natural a “retrasarse” (Golombek & Rosenstein 2010).

Cuando esta situación se repite crónicamente (***jet lag crónico***, **JLC**), como sucede en el caso del trabajo en turnos rotativos (así como en trabajadores de aerolíneas que realizan los mencionados viajes con elevada frecuencia), el reloj nunca logra adaptarse completamente a estos cambios y se produce una desincronía interna. La desincronización interna se define como la pérdida de las relaciones de fase entre los diferentes osciladores periféricos, y entre estos y las variables comportamentales (ritmo de alimentación, sueño-vigilia, etc.) (Golombek 2013). Esta desincronía lleva a un aumento en la susceptibilidad a distintas patologías. Estudios epidemiológicos muestran que alteraciones exógenas de los ritmos circadianos, ya sea por trabajo nocturno o rotativo o por *jet-lag* crónico, aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Peter 1999), indicadores de potencial síndrome metabólico (Karlsson 2001; Karlsson 2003; Al-Naimi 2004) y el riesgo de contraer cáncer (Schernhammer 2003; Stevens 2005). Cabe destacar que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que el trabajo en turnos es un factor de riesgo relevante para el desarrollo de cáncer (Straif 2007).

Distintos estudios en modelos animales han demostrado que la desincronización circadiana lleva a un aumento del peso corporal, niveles de triglicéridos, y de grasa corporal; disminución de los niveles de insulina, junto con perfiles alterados en la expresión de genes reloj en tejidos periféricos (Iwamoto 2014; Herrero 2015; Casiraghi 2016). Adicionalmente, otros estudios con roedores muestran que la disrupción de los ritmos de 24 h inducida por exposición crónica a luz constante (LL) o por JLC incrementa la tumorigénesis (Kothari 1982; Beniashvili 2001; Filipski 2009).

Los modelos de desincronización circadiana resultan de utilidad para estudiar los efectos del reloj circadiano sobre ciertos sistemas y funciones del organismo. En este trabajo de tesis ensayaremos los efectos de la desincronización circadiana en un modelo murino de enfermedad como es la sepsis.

#### **1.4 Metodología de estudio de los ritmos circadianos en roedores.**

Para conocer el funcionamiento del reloj generalmente se recurre al estudio de medidas indirectas, lo que implica registrar una determinada variable (relacionada con una vía de salida del reloj) a lo largo de varios días. En roedores, los ritmos comportamentales como la actividad motora general, la actividad en rueda y los ritmos de alimentación y bebida, son las variables más frecuentemente utilizadas. También hay otras variables, como la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca, la presión arterial y la secreción de hormonas, que presentan ritmos y constituyen buenos indicadores del funcionamiento del sistema circadiano. En este proyecto utilizamos la actividad comportamental, tanto general como en rueda, así como la temperatura corporal para estudiar el funcionamiento del sistema circadiano en diferentes modelos de estimulación inmune (como se explicara más adelante, secciones I.1.2 y II.1.2). A continuación se detallan diferentes análisis que serán utilizados para este fin.

La actividad motora general en roedores se registra utilizando sensores de infrarrojo que detectan el movimiento del animal dentro de la jaula; mientras que la actividad motora en rueda, se mide colocando una rueda de locomoción en la jaula para que el animal corra durante su fase de actividad. En ambos casos

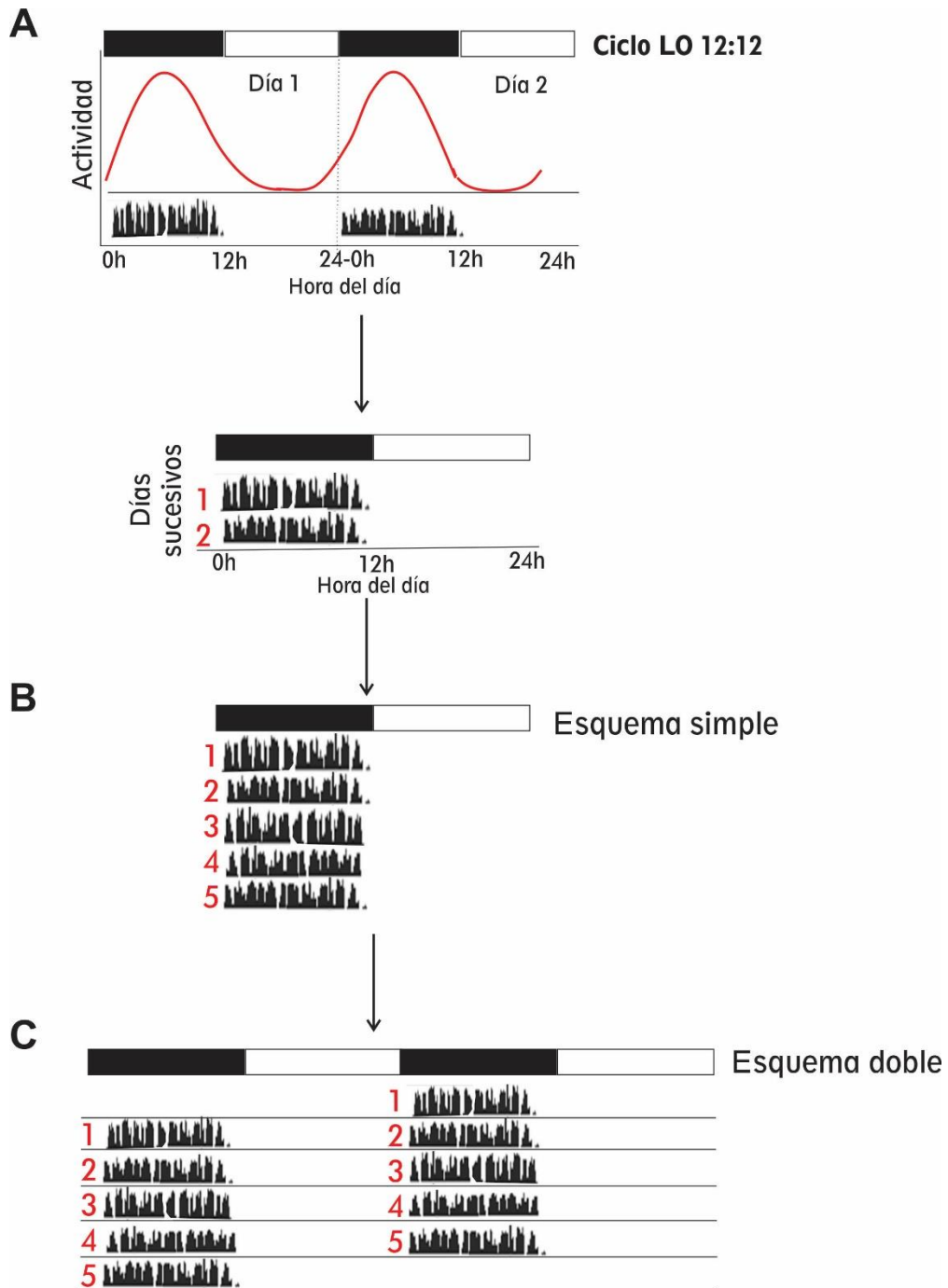


se registra la actividad del animal, en una determinada cantidad de tiempo, mediante un circuito electrónico.

La mayoría de los roedores son animales nocturnos, es decir, que poseen su fase de actividad durante la noche. Para evaluar los ritmos en estos animales, inicialmente se los coloca en un ciclo de LO para que éste sincronice sus ritmos. En un ciclo de LO las horas se denominan de acuerdo al agente externo o *zeitgeber* (en este caso la luz). De esta forma cada hora se denominará **ZT** (*Zeitgeber Time*, hora del *zeitgeber*) y se tomará como ZT0 el momento de encendido de las luces y ZT12 el momento de apagado de las mismas (para aquellos animales que se sincronizan con 12h de luz y 12h de oscuridad como es el caso de los ratones). En este caso se denominarán ritmos diarios y no circadianos, ya que estos están siendo continuamente sincronizados por el *zeitgeber*. Si se desea analizar los ritmos circadianos, los animales se deberán colocar en condiciones constantes o de libre curso, ya que como dijimos anteriormente (sección 1.1.2) los ritmos deben mantenerse en dichas condiciones para ser considerados circadianos. En condiciones de **oscuridad constante (OO)**, libre curso en el caso de utilizar la luz como *zeitgeber*, el día se divide en 24 horas circadianas, a las que llamaremos horas circadianas (CT, ***Circadian Time***) y cada una corresponde al período del animal/24. El punto de referencia es CT12, que corresponde al inicio de actividad locomotora en animales nocturnos (por analogía con ZT12 donde se apagan las luces y los animales comienzan su periodo de actividad). Las demás horas (**CTs**) se expresan relativas a ese momento.

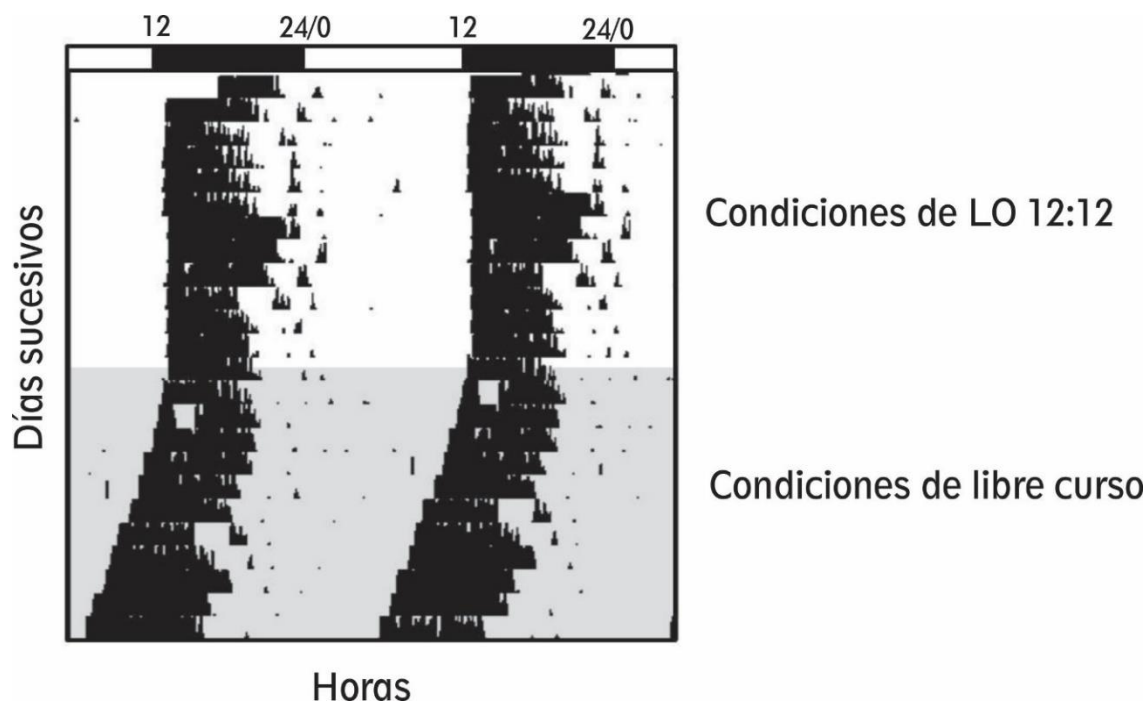
### 1.4.1 Los actogramas

Para la presentación de los datos en Cronobiología, se utiliza un gráfico denominado **actograma**, cuyo esquema de construcción se representa en la Figura 1.10. En este tipo de gráfico, el eje X representa las horas del día, mientras que el eje Y, representa los días sucesivos (Figura 1.10 A). Suponiendo que lo que se está registrando es la actividad motora de un roedor, entonces, cada vez que el animal se muestra activo, se dibuja una línea en el actograma (en el día y hora correspondiente). En la Figura 1.10 A, se muestra la onda sinusoidal que representa el ritmo de actividad del animal, con el pico de la onda que representa el máximo de actividad durante la fase nocturna; y el valle de la onda que representa la actividad del animal durante el día. Como en el eje X se representan las 24 horas del día, si un animal nocturno está en condiciones de LO12:12 (12hs de luz y 12hs de oscuridad; como en el ejemplo de la Figura 1.10 B), en el gráfico se observará una franja vertical oscura que coincide con la fase de oscuridad del ciclo de luz. Para facilitar la visualización, muchas veces los actogramas se representan de forma duplicada, es decir, el eje X representa 48 horas; como se puede observar en la Figura 1.10 C.



**Figura 1.10 Construcción de un actograma.** A) Oscilación de la actividad motora durante dos días sucesivos en un ciclo LO12:12 representada por una curva sinusoidal asociada al registro crudo de actividad. Debajo se muestra el esquema típico de un actograma de actividad: la actividad correspondiente al día 2 se pone por debajo de la del día 1. B) Actograma de esquema simple. Al igual que se explicó en A, las horas del día van en el eje X mientras que los días sucesivos se “apilan” en el eje y. C) Actograma de esquema doble. Se construye un actograma simple y se coloca al lado una copia del mismo, pero de manera que queden desfasados en un día. De esta forma al terminar el día 1 al lado comienza el día 2. Las barras negras y blancas que se encuentran arriba de cada gráfico representan el ciclo LO: negro corresponde a la fase de oscuridad y blanco a la fase de luz.

En la Figura 1.11 se observa un actograma de esquema doble de un animal alojado en condiciones de LO12:12 en las primeras semanas, y luego en condiciones de oscuridad constante o libre curso.



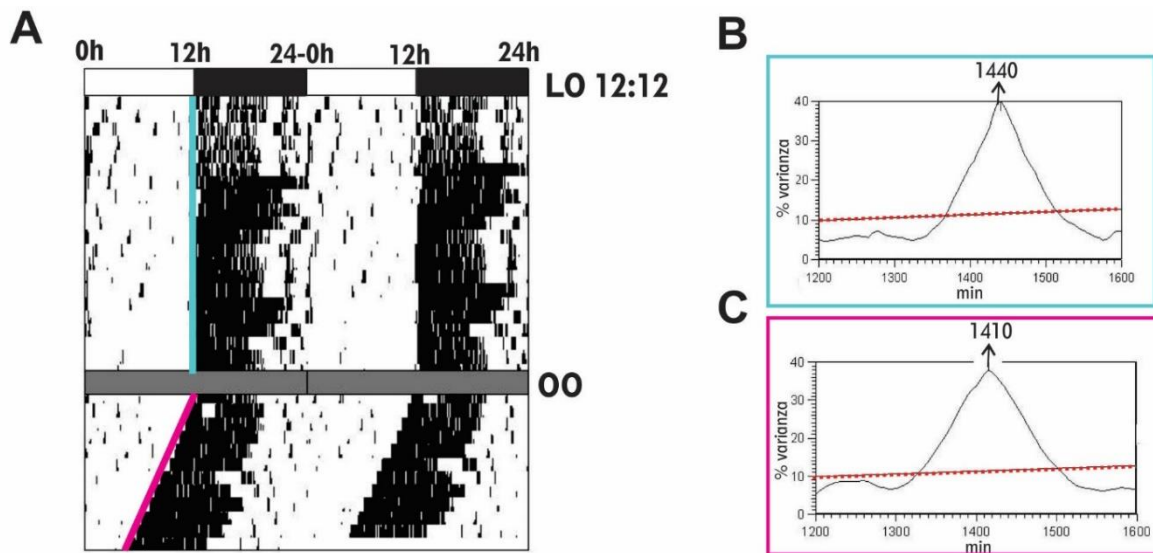
**Figura 1.11 Representación de un Actograma de esquema doble.** En el eje X se representan las horas circadianas, y en eje Y los días sucesivos. En la parte superior se muestra el registro en condiciones de LO12.12; mientras que la parte inferior esquematiza el registro en condiciones de oscuridad constante o de libre curso. El animal registrado posee un período endógeno de actividad locomotora menor a las 24h. Las barras negras y blancas que se encuentran arriba del gráfico representan el ciclo de LO.

#### 1.4.2 Análisis de los parámetros de un ritmo circadiano

Para poder analizar los diferentes parámetros de estos ritmos se debe usar un marcador de fase, es decir, un momento particular de la oscilación. Cuando se trabaja con ritmos de actividad locomotora, generalmente se utiliza el momento de inicio de la fase de actividad (también llamado *onset*). Para animales nocturnos, en condiciones de LO el inicio de actividad coincide con el horario de apagado de luces. Por otro lado, como se explicó previamente, en condiciones de OO, se define el CT12 al momento de inicio de la actividad, y

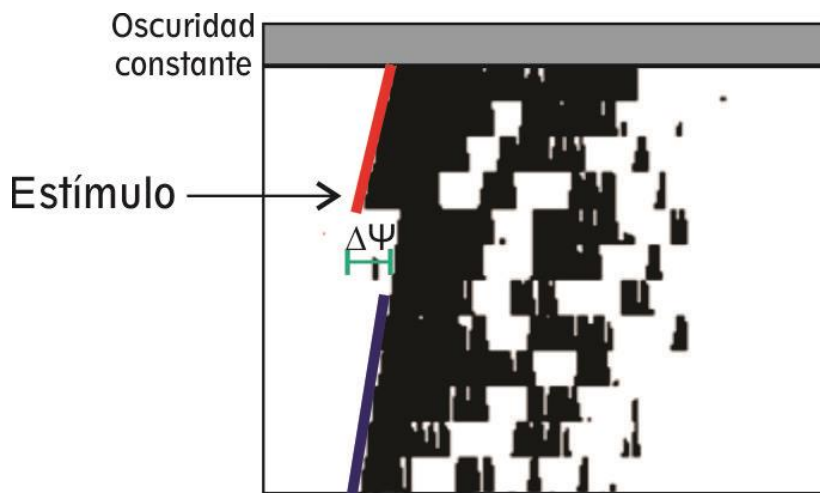
como “noche subjetiva” a fase de actividad del animal mientras que la fase de reposo es el “día subjetivo”.

Como se mencionó previamente (sección 1.2.1) el período es uno de los parámetros con los cuales se caracteriza una variable rítmica. En cronobiología es muy común estudiar el período endógeno del modelo dado, como parte de su caracterización circadiana o con el objeto de analizar si éste parámetro se modifica ante ciertos estímulos. Para ello se utilizan representaciones denominadas periodogramas, que buscan periodicidad en una serie de datos mediante métodos matemáticos. El periodograma grafica los posibles períodos (dentro de un intervalo elegido) en el eje X y el porcentaje de varianza que se explica al alinear los datos utilizando cada uno de los posibles periodos, en el eje Y, cuando este valor supera la línea de significación corresponde al o los período/s de dichos datos (picos observables en la gráfica de la Figura 1.12). En la Figura 1.12 se muestran los periodogramas correspondientes al actograma. En condiciones de LO12:12 (parte superior del actograma) el animal exhibe un período que se corresponde con el ciclo ambiental de 24h o, lo que es lo mismo, 1440 minutos, como lo informa el periodograma de la Figura 1.12 B. En cambio, cuando el animal es expuesto a condiciones de OO, se puede observar su período endógeno que es de 23,5h o 1410 minutos (Figura 1.12 C).



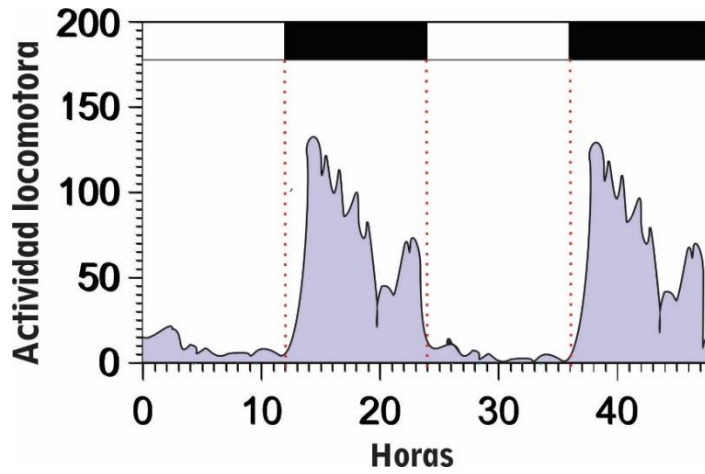
**Figura 1.12 Análisis del período de actividad locomotora mediante periodogramas.** A) Actograma de un animal que estuvo en condiciones de LO (parte superior) y luego pasó a condiciones de OO. Periodograma correspondiente al intervalo de B) LO y C) OO. En LO el animal exhibió un período de 1440 min (24h), como muestra el pico del periodograma, que sobrepasa la línea de significancia (línea punteada roja). En cambio, su período endógeno (en OO) fue menor: 1410min (23.5h).

A menudo también se analiza si un determinado estímulo induce un cambio en la fase de un ritmo dado (induciendo adelantos o retrasos como se explicó previamente en las secciones 1.2.1 y 1.2.3). Como se muestra en la Figura 1.13, para realizar dicho análisis, se debe identificar primero el marcador de fase que se va a utilizar (en este caso el *onset*). Luego se traza una línea uniendo los *onsets* de los días sucesivos anteriores al día del estímulo (línea roja en la figura) y otra, con los *onsets* de los días sucesivos posteriores (línea roja en la figura) al día del estímulo. En general, los primeros días luego del estímulo no se tienen en cuenta, ya que la fase no se encuentra estable. Por último, se evalúa la diferencia tiempo (horas o minutos) entre la fase previa y la fase posterior al estímulo, obteniendo el “cambio de fase” ( $\Delta\Psi$ ). En el ejemplo de la figura se observa un retraso de fase.



**Figura 1.13 Análisis del cambio de fase de la actividad locomotora sobre un actograma.** Se trazan líneas uniendo los inicios de la actividad u *onsets* de los días previos y posteriores al estímulo. La diferencia entre ambas rectas (en tiempo) corresponde al cambio en la fase. En este caso se grafica un retraso en la fase.

Adicionalmente, con el fin de analizar los patrones de actividad, se realiza un gráfico (denominado forma de onda, *waveform*), el cual resume los patrones de actividad de muchos días. En estos gráficos, el eje Y muestra el promedio de la actividad para cada punto horario de varios días sucesivos de registro, mientras que en el eje X se colocan las horas del día (u horas circadianas cuando corresponde), como muestra la Figura 1.14. En condiciones de LO, dicho promedio se realiza utilizando un período de 24 h (el período del *zeitgeber*), mientras que en condiciones de OO se utiliza el período del animal correspondiente. Este tipo de gráfico es de mucha utilidad para estudiar la distribución promedio de la actividad a lo largo de los días. Para ello se calcula el área bajo la curva (en color celeste en la Figura 1.14) en el intervalo temporal que se desea estudiar. Estos gráficos se utilizan también para calcular la duración del día y la noche subjetivos, denominados  $\alpha$  y  $\rho$ , respectivamente. Para ello se grafica la línea media de actividad y se cuantifica el tiempo en el cual la curva está por encima de esta media, el cual corresponde a  $\alpha$ , mientras que el tiempo que transcurre por debajo de esta corresponde a  $\rho$ .



**Figura 1.14 Análisis del patrón de actividad.** Gráfico de waveform que se utiliza para estudiar la distribución promedio de la actividad a lo largo de los días de una serie temporal. Para ello se calcula el área bajo la curva (color celeste) en el intervalo temporal elegido. En este caso corresponde a la actividad de un animal en condiciones de LO12:12.

Ahora que conocemos las características básicas del sistema circadiano, nos vamos a enfocar en el sistema inmune, el otro protagonista de este trabajo.



## **2. EL SISTEMA INMUNE**

### **2.1 Organización del sistema inmune**

El sistema inmune es el encargado de proteger al organismo de la invasión de microorganismos patogénicos, como virus, hongos o bacterias; o partículas derivadas de estos, como toxinas. Este sistema está formado por los órganos linfoides primarios, que son el timo y la médula ósea, donde se desarrollan y maduran los leucocitos; los órganos linfoides secundarios, que son los nódulos linfáticos, el bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas. Estos últimos concentran las moléculas derivadas de los patógenos, promoviendo su contacto con los linfocitos y, por lo tanto, el desarrollo de la respuesta inmune antimicrobiana. Y, por último, los vasos linfáticos que comunican los órganos linfáticos entre sí y con el sistema circulatorio.

Podemos encontrar células inmunes de origen mieloide, como monocitos y su estadio diferenciado, los macrófagos, los granulocitos neutrófilos, basófilos y eosinófilos, y algunas células dendríticas (CD). También encontramos células de origen linfoide como los linfocitos B y T, las células asesinas naturales (NK, *natural killer*) y otras CDs.

Asimismo, este sistema posee dos tipos de respuesta: innata y adaptativa, las cuales se explican a continuación. Los macrófagos, granulocitos y células NK participan en la respuesta innata, en tanto que los linfocitos son responsables de la respuesta adaptativa. Las CD, por su parte, son el principal nexo entre ambas respuestas, dado que se activan en los tejidos durante la respuesta innata y

migran a los órganos linfoides secundarios para inducir allí la respuesta adaptativa (Gasteiger 2017; Murphy 2017).

### 2.1.1 Sistema inmune innato

Barreras naturales: La primera defensa contra un patógeno es llevada a cabo por las barreras físicas que representan la piel y las superficies mucosas presentes en los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario, a través de las uniones estrechas presentes entre sus células. Estas barreras previenen la entrada de posibles patógenos y, además, facilitan su degradación a través de la producción de enzimas y péptidos antimicrobianos, como las  $\beta$ -defensinas y las catelicidinas (Nochi & Kiyono 2006; Dwivedy & Aich 2011). En las superficies mucosas, además, la acción de los cilios “barren” la capa de mucus, junto con los potenciales patógenos que allí quedan adheridos, ayudados por la acción mecánica de la tos y el estornudo, mientras que las lágrimas y la saliva poseen lisozimas bacteriolíticas. La acidez gástrica también desempeña un papel fundamental en la eliminación de los microorganismos atrapados en las secreciones mucosas (Fainboim 2011).

Receptores de Reconocimiento de Patrones (RRPs): Las células de la inmunidad innata (principalmente macrófagos y CD), al igual que las células epiteliales, poseen **RRPs** capaces de reconocer a los microorganismos y sus productos, al interactuar con los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (**PAMPs**). Estos PAMPs, que pueden ser proteínas, lípidos, hidratos de carbono o ácidos nucleicos, son moléculas conservadas por grandes clases de microorganismos y no están presentes en el hospedador. Dado que los RRPs están codificados en la línea germinal de dichas células y se expresan

constitutivamente (previo a su activación), la respuesta innata se dispara en forma inmediata una vez que el microorganismo logró superar las barreras naturales. Entre los RRP's podemos mencionar a los receptores tipo Toll (**TLRs**, de Toll-like receptor), de tipo NOD, o Lectina de tipo C, entre otros (Akira 2006; Fainboim 2011). En relación a los TLRs, existen varios subtipos como TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6 que reconocen lípidos, mientras que TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen ácidos nucleicos. En este trabajo de tesis nos interesa particularmente **TLR4** que reconoce el **lipopolisacárido bacteriano (LPS)**, cuyas vías de señalización discutiremos más adelante (sección 2.3).

Respuesta inflamatoria: La activación de los RRP's, ante la presencia de sus ligandos, activa a las células de la inmunidad innata, induciendo la respuesta inflamatoria. Esta respuesta implica la producción de un conjunto de moléculas antimicrobianas y mediadores inflamatorios (como citoquinas, quemoquinas y mediadores lipídicos), responsables de activar los diferentes mecanismos humorales y celulares de la inmunidad innata y la adaptativa.

El sistema del complemento, principal mecanismo humoral de la inmunidad innata, se compone de aproximadamente 30 proteínas, sintetizadas por los hepatocitos, que se encuentran en forma inactiva en la sangre y fluidos extravasculares, en ausencia de infección, y que se activan por proteólisis secuencial ante la presencia del estímulo, induciendo la lisis bacteriana y la producción de otros mediadores inflamatorios (Dunkelberger & Song 2010).

Un concepto importante a tener cuenta es que las células inmunes se comunican entre sí a través de la secreción de **citoquinas** y **quemoquinas**. En ambos casos se trata de varias familias de pequeñas proteínas (alrededor de 25 kDa), que son secretadas por diferentes células inmunes en respuesta a

estímulos específicos. Las citoquinas pueden actuar de manera autócrina, parácrina y/o endócrina, y desencadenar efectos específicos en la célula blanco, los cuales dependen de cada par particular citoquina/célula blanco, como por ejemplo activación celular o secreción de otras citoquinas. Por otro lado, las quemoquinas inducen quimiotaxis en la célula blanco, dirigiéndolas hacia la zona en la cual están siendo secretadas (Turvey & Broide 2010; Fainboim 2011).

En cuanto a los mecanismos celulares, las primeras células que se activan ante la presencia de un microorganismo son los **macrófagos** y **CD** tisulares, al cual reconocen mediante sus RRP. Dicha señalización induce la fagocitosis de los microorganismos y su destrucción intracelular mediante especies reactivas del oxígeno y enzimas antimicrobianas. Adicionalmente, ambos tipos celulares secretan citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12, y quemoquinas, como IL-8 y CCL2 (quimioattractantes de monocitos y neutrófilos principalmente), y mediadores lipídicos, como prostaglandinas, leucotrienos y eicosanoides (Serhan 2014). Dichas quemoquinas inducen la extravasación de monocitos (que se diferencian a macrófagos) y neutrófilos, desde la sangre al tejido, donde potencian la respuesta inflamatoria. Cabe resaltar en este punto la participación de **TNF- $\alpha$**  y **CCL2** (también conocida como MCP1) dado que nos referiremos a ellas posteriormente en relación al sistema circadiano. CCL2, a través de su receptor CCR2B, atrae monocitos al sitio de la infección en el cual se diferencian a macrófagos (Deshmane 2009).

En conjunto, dichas moléculas, inducen alteraciones locales y sistémicas. En cuanto a los efectos locales, se induce la activación del endotelio (modificando su patrón de moléculas de adhesión a fin de promover la extravasación de leucocitos al tejido), vasodilatación, con la consecuente baja

de flujo sanguíneo (para favorecer la extravasación celular), aumento de la permeabilidad vascular y coagulación de los microvasos, generando en conjunto el conocido patrón “dolor, rubor, calor e hinchazón” en el sitio de infección (Turner 2014; Murphy 2017).

En cuanto a los efectos sistémicos, las mencionadas citoquinas pro-inflamatorias inducen la respuesta de fase aguda, en la cual el hígado comienza a producir moléculas que potencian la respuesta inmune como más citoquinas, proteínas del complemento, proteínas involucradas en la vía de coagulación, y enzimas proteolíticas, como la Proteína C reactiva, la haptoglobina y la Proteína Amiloide A, entre otras (Gruys 2005; Cray 2009). Adicionalmente, a nivel hipotalámico se inducen modificaciones de la temperatura corporal a las cuales nos referiremos en la sección II.1.1.5.

### **2.1.2 Sistema inmune adaptativo**

Esta respuesta es llevada a cabo por los **linfocitos B** y **T**, cuya característica principal, la cual las diferencia de las células de la inmunidad innata, es que sus receptores (BCR y TCR, respectivamente) son específicos de antígeno. Estos receptores se generan, en los órganos linfoides primarios, a través de la recombinación somática de un gran número de segmentos génicos, los cuales, no solo se eligen al azar, sino que también se agregan nucleótidos al azar entre ellos. Este proceso da lugar a una gran cantidad de células con receptores diferentes (en la zona de unión al antígeno), cada una de las cuales se encuentra en bajo número en circulación. Estos linfocitos *naive* (aún no se encontraron con su antígeno específico) recirculan por los órganos linfoides secundarios, si en estos sitios encuentra al antígeno en cuestión, junto con las

señales de activación necesarias, se diferencian a células efectoras y prolifera a una elevada tasa. Este proceso demora 10-15 días, pero genera una gran cantidad de linfocitos efectores con potentes funciones específicas contra el microorganismo en cuestión, y deja, además, una serie de células de memoria con capacidad de activarse más rápidamente ante un posterior encuentro con el mismo microorganismo (aun décadas más tarde) (Bonilla & Oettgen 2010; Murphy 2017).

Los linfocitos B se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos, mientras que los linfocitos T (LT) se diferencian a efectores citotóxicos (los CD8<sup>+</sup>) o colaboradores o *helpers* (los CD4<sup>+</sup>). Los LT CD8<sup>+</sup> efectores eliminan células propias infectadas por virus o tumorales, mientras que los LT CD4<sup>+</sup> pueden diferenciarse en diferentes subtipos (dependiendo de las citoquinas que haya en el órgano linfático secundario al momento del encuentro con el antígeno). Cada subtipo secreta citoquinas diferentes que colaboran con la diferenciación y/o actividad de diferentes tipos celulares (linfocitos B, LT citotóxicos y macrófagos, entre otras) o inhiben la respuesta inmune como las LT CD4<sup>+</sup> regulatorias. Cabe mencionar en este punto, que las CD son esenciales para la diferenciación de los LT, dado que migran desde el tejido inflamado a los órganos linfoides secundarios donde le presentan los péptidos derivados de los microorganismos a dichos linfocitos junto con las citoquinas necesarias para su diferenciación (Gasteiger 2017; Murphy 2017).

## **2.2 Factor de Necrosis Tumoral – $\alpha$**

A continuación describiremos en mayor profundidad los efectos de la citoquina TNF- $\alpha$  en la respuesta inmune, molécula de suma importancia en este

trabajo. Sus acciones dentro del sistema inmune se encuentran bien caracterizadas, pero en los últimos años también se evidenció que posee importantes funciones dentro del **Sistema Nervioso Central (SNC)** las cuales aún se encuentran en estudio (ver secciones 3.1.1 y 3.2).

TNF- $\alpha$  es una citoquina secretada mayormente por macrófagos activados, células T y NK. Fue inicialmente caracterizada por Carswell, en 1975, quien descubrió que la capacidad de inducir la necrosis hemorrágica de tumores en ratones se debía a un factor que se secretaba a la sangre tras administrar LPS, lo que le otorgó su actual nombre (Carswell 1975). Además de sus funciones citotóxicas, esta citoquina afecta el crecimiento, diferenciación y función de muchos tipos celulares, y actúa como mediador de la inflamación y de la respuesta inmune celular. Como se mencionó previamente, al actuar sobre las células endoteliales, estimula la expresión de moléculas de adhesión celular, para promover la extravasación de células como monocitos y neutrófilos. Otra función importante de esta citoquina es estimular la producción de proteínas de la cascada de coagulación, a fin de evitar que el patógeno entre en la circulación sanguínea y se propague en todo el organismo (Murphy 2017). Dentro de sus funciones como inductora de inflamación, cabe mencionar que es un mediador clave del shock séptico inducido tanto por LPS como por otros antígenos bacterianos como describiremos en detalle en el Capítulo II del presente trabajo (Pfeffer 1993; Song 2012).

Inicialmente esta citoquina se expresa como una proteína trimérica transmembrana, que ante señales de activación inducidas por otras citoquinas o por reconocimiento de patógenos a través de RRP, es liberada como una citoquina soluble, luego del clivaje mediado por una proteasa específica

denominada TACE (enzima convertidora de TNF- $\alpha$ ). La presencia de una infección en la sangre, como la sepsis (patología que se estudiará en este trabajo), desencadena la liberación masiva de TNF- $\alpha$  en forma soluble de macrófagos en el hígado, bazo, y otros tejidos del organismo (Murphy 2017).

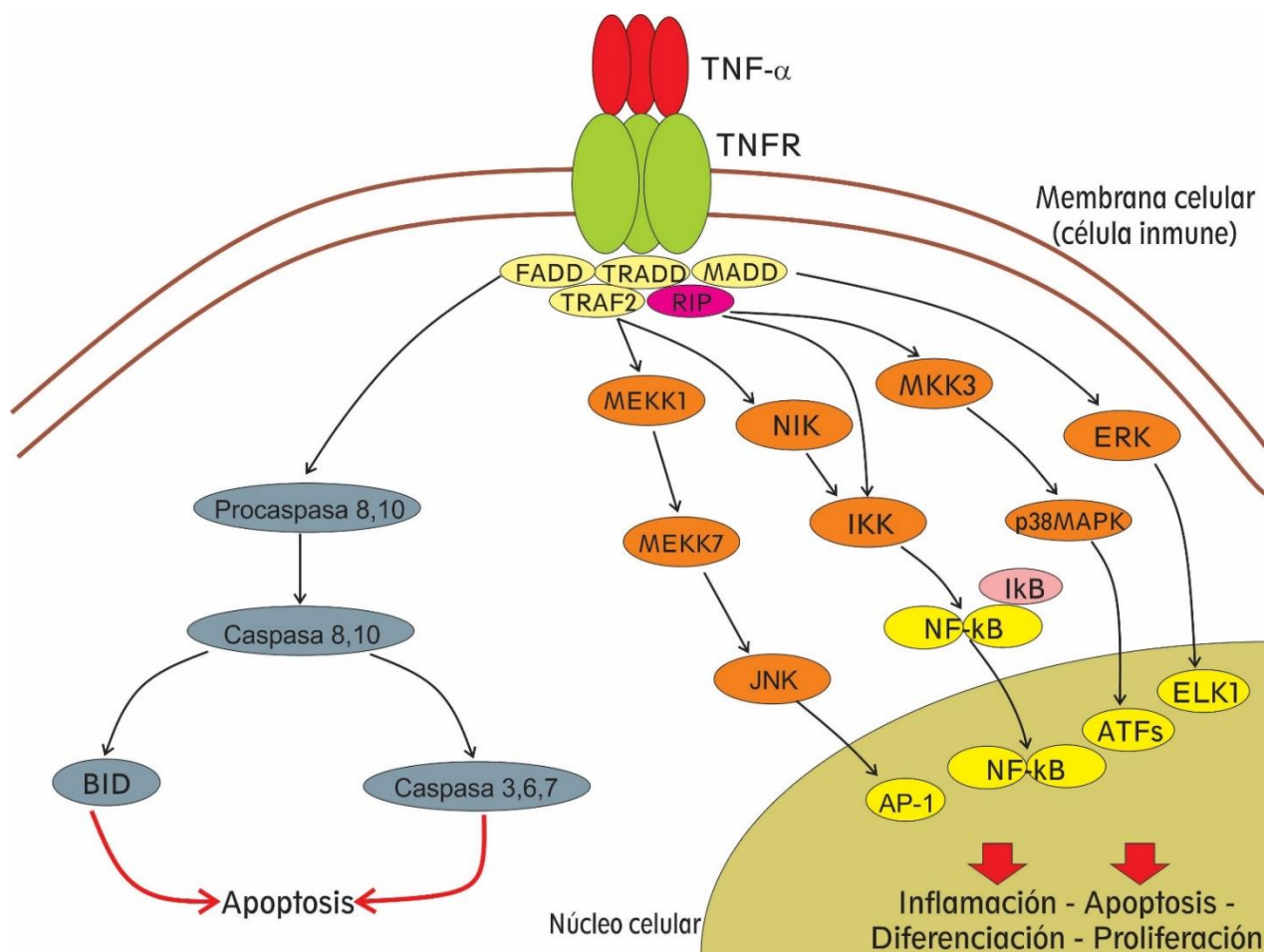
Esta citoquina media sus actividades pleiotrópicas a través de dos receptores de superficie celular: TNFRp55 (TNFR1 o CD120a) y TNFRp75 (TNFR2 o CD120b). Como la citoquina se produce como un trímero, al unirse al receptor induce también su trimerización. Ambos receptores poseen un dominio extracelular estructuralmente similar, pero su señalización se da a través de distintos dominios intracelulares (Wajant 2003). **TNFR1** se expresa en una amplia gama de células, incluyendo células endoteliales y macrófagos; siendo un mediador clave de la inmunidad innata, mientras que TNFR2 se expresa mayormente en linfocitos, y sería más importante en el sistema linfático (Vilcek & Lee 1991; Wajant 2003). De hecho, este último puede ser solamente activado completamente por la unión de TNF- $\alpha$  de membrana, pero no de TNF- $\alpha$  soluble (Grell 1995). Además, se sabe que TNFR1 es necesario para la organización estructural y funcional de los órganos linfoides secundarios (Hehlgans & Pfeffer 2005), para la defensa contra diferentes microorganismos, para la inducción y mantenimiento de varias patologías inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoidea, la esclerosis múltiple (Kollias 1999) y el asma (Doherty 2011), y para la inducción de toxicidad mediada por TNF- $\alpha$  durante el shock endotóxico (Ashkenazi 1991; Mohler 1993).

La unión de TNF- $\alpha$  a TNFR1 activa diferentes cascadas de señalización: una lleva a la activación de NF- $\kappa$ B, a través de la degradación proteolítica del inhibidor I- $\kappa$ B. Por otro lado, también puede llevar a la activación de tres tipos de



quinasas pertenecientes al grupo de proteínas activadas por mitógenos (MAP):

- 1) las quinasas N-terminales de c-Jun (JNK), que se traslocan al núcleo y aumentan la actividad del factor de transcripción AP-1, lo que lleva a la expresión de colagenasas y de la quemoquina CCL2, entre otras cosas;
- 2) las p38 MAP quinasas (p38MAPK), que al ingresar al núcleo producen un aumento en la función de los factores de transcripción activadores (ATFs; también conocidos como CREB), involucrados en la respuesta al estrés y en el mantenimiento de la homeostasis celular;
- y 3) las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), que son las encargadas de aumentar la actividad del factor de transcripción ELK1, que activa la expresión del gen cFos. Adicionalmente, esta unión puede llevar al reclutamiento de la caspasa 8, resultando en la inducción de apoptosis celular, sin embargo, esto sucede con menor frecuencia que la inducción de procesos inflamatorios (Persengiev & Green 2003; Sabio & Davis 2014; Borghi 2016). Se ha evidenciado que la activación de NF- $\kappa$ B inhibe la inducción del mecanismo de apoptosis, y viceversa (Wajant 2003). En la Figura 2.1 se resumen las vías de señalización desencadenadas por la unión de TNF- $\alpha$  al receptor TNFR1.



**Figura 2.1 Vía de señalización de TNF- $\alpha$  a través del receptor TNFR1.** La unión de TNF- $\alpha$  a su receptor provoca una cascada de señalización que puede llevar a la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, AP-1, ATF5 y ELK1, a través de la traslocación al núcleo de distintas quinasas; como así también al reclutamiento de la caspasa 8, desencadenando la apoptosis celular.

Para prevenir una respuesta inflamatoria excesiva o inapropiada, la señalización mediada por TNF- $\alpha$  está regulada. Por un lado, la señalización constitutiva está bloqueada por la unión del dominio de silenciamiento de muerte (SODD, por sus siglas en inglés) al dominio intracitoplasmático de TNFR1. Cuando la citoquina se une a su receptor, SODD se libera y así se forma el complejo de señalización activo de TNFR1 (Jiang 1999). El segundo mecanismo de regulación es a través de la liberación del receptor de la superficie celular,

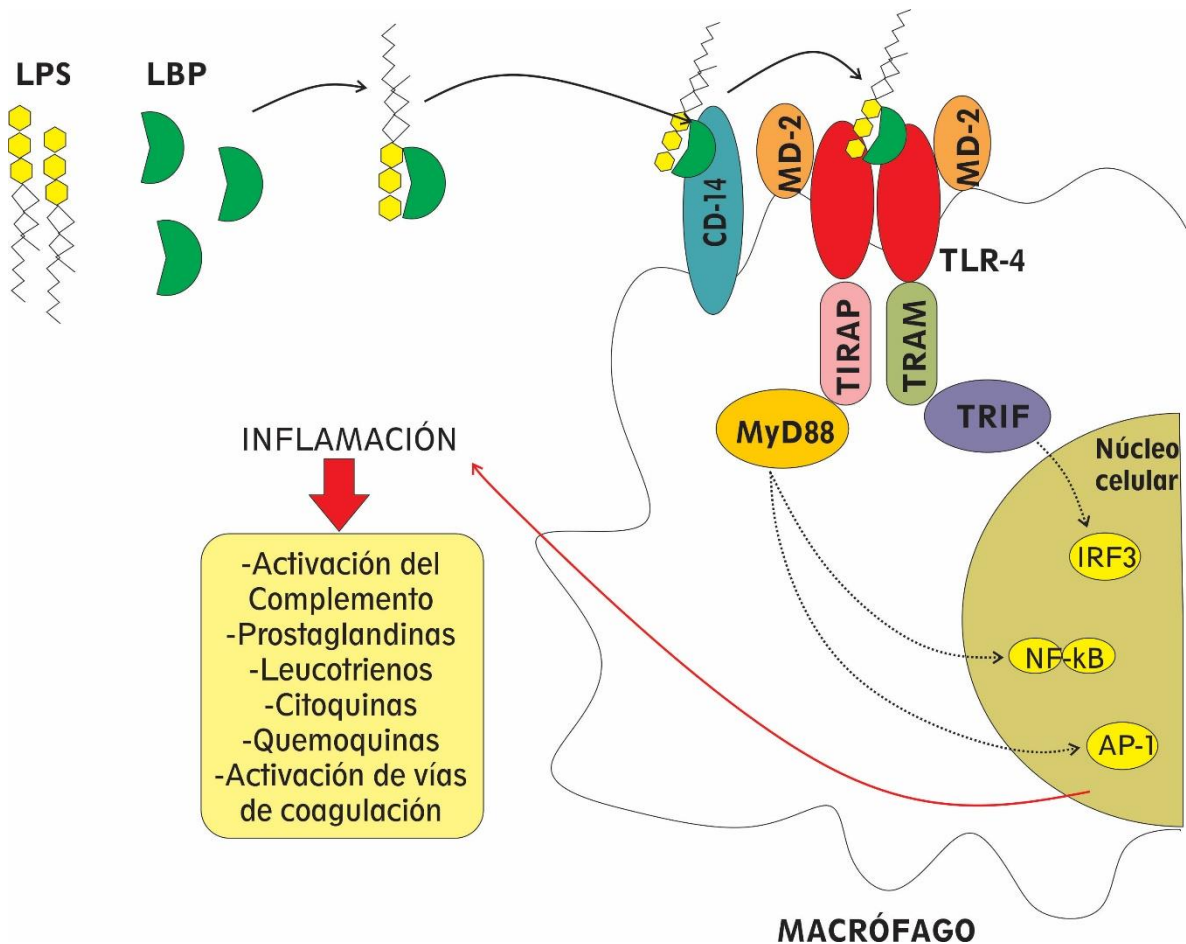
que funciona como un receptor soluble de TNF- $\alpha$  (TNFRs), que inhibe su bioactividad al competir con el receptor presente en la membrana celular. Los receptores solubles de TNF- $\alpha$  también se pueden unir reversiblemente a la citoquina para estabilizar su forma trimérica, y prolongar su vida media y además funcionar como un reservorio (Hale 1995; Hawari 2004).

### **2.3 Endotoxinas como activadores de la respuesta inmune**

Dado que en este trabajo de tesis se plantea estudiar la interacción entre el sistema inmune y el sistema circadiano utilizando diferentes modelos de inoculación de LPS, en esta sección describiremos las vías de activación que induce dicha endotoxina. El LPS es el principal componente de la membrana exterior de las bacterias Gram negativas. Esta molécula está conformada por un poli u oligosacárido, unido a un fosfolípido, denominado Lípido A. Este último está formado por derivados de ácidos grasos unidos a un disacárido de glucosaminas, y posee una estructura que se conserva evolutivamente en distintos tipos bacterianos (Caroff 2002). Como ya mencionamos anteriormente, las células de la inmunidad innata interaccionan con el LPS a través del receptor TLR4, particularmente pueden reconocer al Lípido A a nivel de picomolar (Alexander & Rietschel 2001).

El TLR4 reconoce el LPS con la ayuda de las proteínas accesorias CD14 y MD-2. Como se muestra en la Figura 2.2, en plasma, la molécula de LPS se une a una proteína soluble denominada Proteína de Unión a LPS (*LBP - LPS Binding Protein*), la cual posibilita su interacción con la proteína de membrana CD14. La proteína CD14 interacciona con TLR4, que a su vez forma un complejo con otra proteína de membrana, MD-2. Cuando el complejo TLR4:MD-2

interactúa con el LPS, se desencadenan cascadas de señalización mediadas por las proteínas MyD88 y TRIF, que finalizan con la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, AP1 e IRF3. Estos últimos inducen la expresión de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas, que desencadenan la activación de la respuesta inflamatoria, a través de los mecanismos mencionados en la sección 2.1.1 (Alexander & Rietschel 2001; Rosadini & Kagan 2017).



**Figura 2.2 Respuesta inmune al LPS.** La molécula de LPS se une a la proteína LBP, de esta forma es reconocida por el receptor CD14 unido a la membrana celular. CD14 interactúa con el complejo formado por el TLR4 junto con la proteína accesoria MD2, este último complejo se dimeriza y se desencadenan distintas cascadas de señalización que terminan en la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, AP-1 e IRF3. Estos tres en conjunto activan la expresión de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas que desencadenan la respuesta inflamatoria.

### **3. NEURO-INMUNOLOGÍA**

#### **3.1 El surgimiento de un nuevo campo de estudio**

Al estar enfermos todos alguna vez experimentamos síntomas como fatiga, falta de apetito (anorexia), malestar, mayor sueño, fiebre, etc. Estos síntomas conforman el denominado “comportamiento de enfermedad” (*sickness behavior*; (McCusker & Kelley 2013)). Esto indica que, frente a un estímulo inmune el organismo responde afectando variables que están controladas por el SNC. Asimismo, se han observado alteraciones de componentes inmunes en pacientes con desórdenes neurológicos (Drexhage 2011; Jevtic 2017). Esto indica que el SNC recibe señales desde el sistema inmune, a las cuales responde; y viceversa. Esto pareciera ser muy evidente, pero hace pocos años que los neurocientíficos comenzaron a trabajar en conjunto con los inmunólogos, en este nuevo campo que es la Neuro-inmunología.

Recién hace unos 20 años se dilucidó que los síntomas relacionados al “comportamiento de enfermedad” son desencadenados por las citoquinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , producidas, como se menciona en la sección 2.1.1, por las células de la inmunidad innata (Dantzer 2009). Para que esto sea posible, estas citoquinas, al igual que sus receptores, se expresan en el SNC y, además, pueden llegar al cerebro desde la periferia a través de distintas vías que describiremos más adelante (Licinio & Wong 1997; Turrin 2001; Utsuyama & Hirokawa 2002). También se ha observado que las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 pueden actuar en el SNC en condiciones fisiológicas promoviendo el sueño y

modificando la estructura del mismo (Krueger 2008; Rockstrom 2018). Adicionalmente, se ha observado que dichas citoquinas pueden activar el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA), eje neuroendócrino encargado de modular la secreción de glucocorticoides, hormonas con importante actividad inmunosupresora (Turnbull & Rivier 1999).

### **3.1.1 La respuesta inmune en el sistema nervioso central**

El SNC es un órgano complejo y su respuesta inmune también es más especializada que la que ocurre en la periferia. Entre sus cualidades particulares se incluyen: la falta de vasos linfáticos que lo recorran, la presencia de una barrera física como la **Barrera Hemato-Encefálica (BHE)**, y la presencia de células con funciones inmunes específicas de este sistema, pero distintas a las que existen en la periferia (Forrester 2018). En cuanto a la BHE, se trata de una barrera mecánica que separa el SNC de la periferia, constituida por células endoteliales (que rodean la gran cantidad de vasos sanguíneos presentes en el cerebro) unidas fuertemente unas a otras a través de uniones estrechas y adherentes (Ballabh 2004). Estas uniones restringen y previenen la entrada de moléculas y células presentes en el flujo sanguíneo. Sin embargo, cuando se desencadena una respuesta inmune en el cerebro estas uniones se alteran. Se ha observado que son específicamente sensibles a las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, secretadas durante el proceso inflamatorio (Hawkins & Davis 2005). Además, la BHE actúa como una interface entre el SNC y la circulación para mantener el ambiente adecuado para un correcto funcionamiento de las células del SNC. Es por ello que utiliza mecanismos de transporte selectivo, que bloquean el paso de sustancias potencialmente tóxicas y permiten que ingresen

moléculas requeridas para el funcionamiento de las células nerviosas (Mackic 2002; Deane 2009).

Las células que participan en la respuesta inmunológica en el SNC son las células gliales, principalmente microglía y astrocitos, que se encargan de la defensa del SNC de injurias e infecciones montando procesos inflamatorios. Las células de la microglía son quienes llevan principalmente a cabo las funciones fagocíticas en el SNC, al igual que los astrocitos expresan un gran número de RRP, que una vez activados, desencadenan la secreción de una variedad de citoquinas y quemoquinas que son detectadas tanto por otras células gliales como por neuronas, contribuyendo a la propagación de la señal inflamatoria. Además, las citoquinas secretadas por los astrocitos promueven cambios en la BHE (a la cual los astrocitos rodean), lo que resulta en el reclutamiento de células inmunes periféricas (Ransohoff & Engelhardt 2012; Lampron 2013; Clark 2019). Estos procesos se encuentran altamente regulados y contrabalanceados por respuestas anti-inflamatorias y neuroprotectoras, ya que la activación glial excesiva resulta en daño neuronal crónico.

### **3.1.2 Comunicación neuroinmune**

Una vez que ocurre una infección en los órganos periféricos, tanto las citoquinas como las toxinas bacterianas llevan la información al cerebro utilizando vías de comunicación humorales y neuronales. El estudio de esta comunicación es sumamente importante, ya que una gran parte de las funciones inmunes y de los síntomas desarrollados durante las patologías son modulados por el SNC. Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos llevados a cabo durante dicha modulación, nos permitiría comprender mejor ciertas patologías

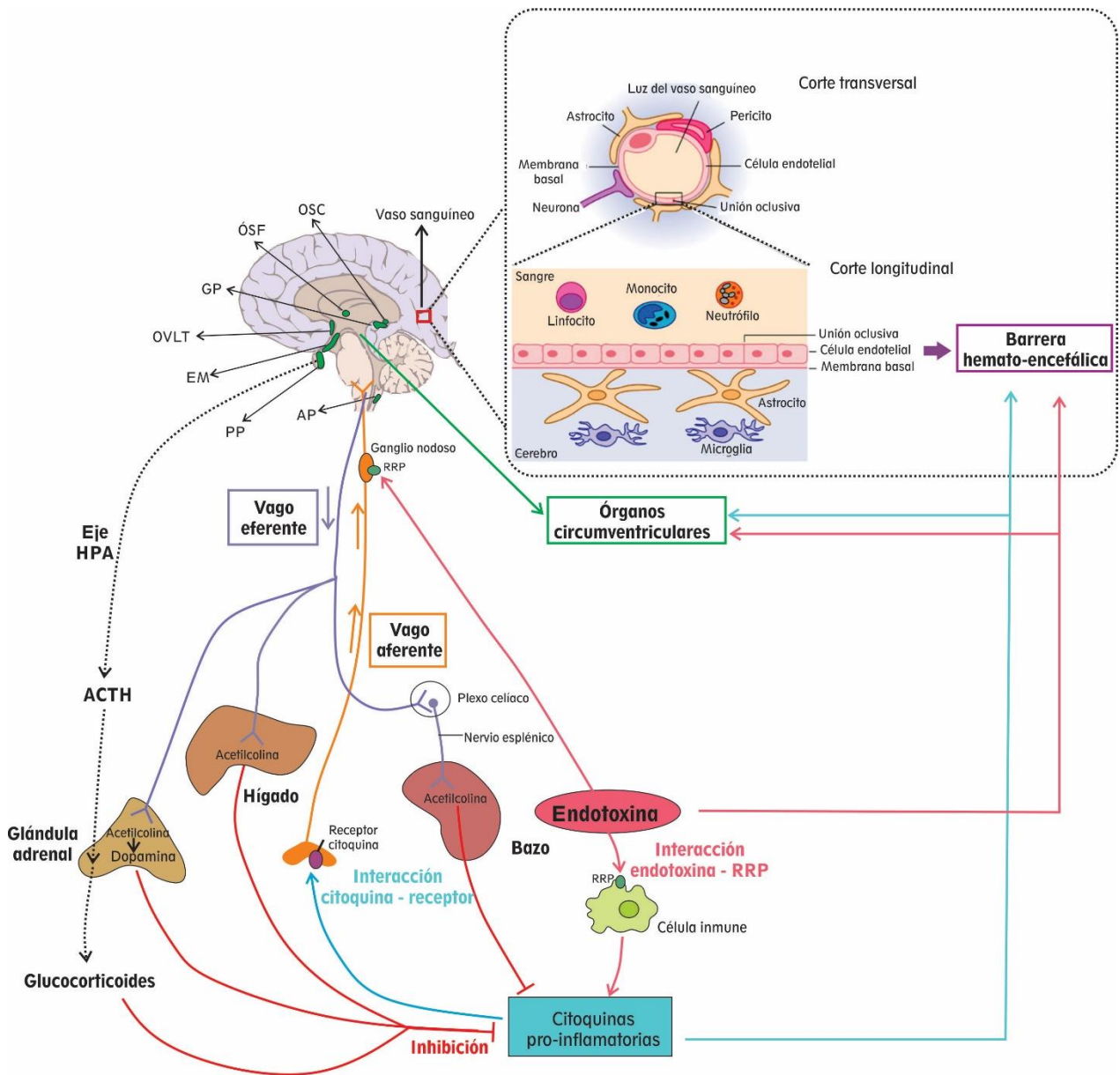
complejas, como la sepsis (modelo de estudio que se utilizará en esta tesis), y poder desarrollar mejores terapias, que tengan en cuenta el panorama completo de la enfermedad.

Como se esquematiza en la Figura 3.1, cuando la endotoxina ingresa al organismo, puede ser reconocida por RRP's presentes en el vago aferente, que es capaz de comunicarse con el tallo cerebral inferior (núcleo del tracto solitario) que envía señales a centros cerebrales como el hipotálamo o la amígdala (Bonaz 2017). También, las células endoteliales que conforman la BHE (ver recuadro Figura 3.1) poseen RRP's, capaces de iniciar cascadas de señalización que finalizan con la expresión de citoquinas y quemoquinas dentro del cerebro (Mallard 2012; Johnson 2018). Por su parte, las citoquinas secretadas en periferia durante la respuesta inflamatoria también pueden actuar sobre las células endoteliales de la BHE iniciando un proceso inflamatorio dentro del cerebro; o bien pueden romper las uniones estrechas de las células que conforman la BHE y de esta forma ingresar directamente al cerebro (Almutairi 2016). También estas moléculas pueden llegar al cerebro a través de los **órganos circumventriculares**, que son estructuras localizadas alrededor de los ventrículos cerebrales, cuya BHE es más laxa; lo que permite que se liberen hormonas producidas por estos órganos y que moléculas presentes en la sangre puedan ingresar al cerebro. Ha sido reportado que estos órganos tienen receptores tanto para PAMP's como para citoquinas (Roth 2004; McCusker & Kelley 2013). Por último, estas citoquinas también pueden actuar sobre las terminales nerviosas del nervio vago aferente, iniciando un mecanismo denominado "reflejo inflamatorio". Al activarse las señales aferentes del nervio vago, el SNC puede censar la existencia de inflamación periférica y activar la vía



colinérgica anti-inflamatoria, que culmina con la liberación del neurotransmisor acetilcolina en los tejidos periféricos. Los receptores para acetilcolina se encuentran presentes en monocitos, macrófagos, linfocitos, y CD, y su señalización disminuye la expresión de CD14 y TLR4, como así también de citoquinas pro-inflamatorias (Borovikova 2000; Pavlov & Tracey 2012). De esta forma se evita el posible daño que pudiera ocasionar una activación inmune excesiva, sin afectar la liberación de factores anti-inflamatorios.

Por último, como ya mencionamos, la llegada al SNC de estímulos inmunes activa el eje HPA, específicamente las células de los NPV liberan la hormona CRH, que induce la liberación de la hormona ACTH de la hipófisis, la cual al actuar sobre la glándula adrenal promueve la síntesis y secreción de glucocorticoides. Estos últimos tienen un importante rol anti-inflamatorio, disminuyendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, entre otras cosas (Hueston & Deak 2014; Herman & Tasker 2016).



**Figura 3.1 Vías de comunicación entre el sistema inmune y el SNC.** Al ingresar al organismo la endotoxina (en color rosa) es detectada por las células de la inmunidad innata y desencadena una respuesta inflamatoria, que se caracteriza por la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (en color celeste). Tanto la endotoxina como las citoquinas secretadas, pueden señalizar directamente al SNC actuando sobre los receptores presentes en las células endoteliales que componen la BHE, los presentes en los órganos circumventriculares (en color verde sobre el cerebro) o los que están en las terminales nerviosas del nervio vago aferente. Los estímulos inmunes recibidos en las terminales vagales desencadenan un mecanismo denominado “reflejo inflamatorio”. De esta forma el SNC censa la activación inmune periférica, y responde liberando el neurotransmisor acetilcolina en los tejidos periféricos inervados por el nervio vago eferente. La señalización por acetilcolina regula la activación inmune periférica, disminuyendo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, entre otras cosas. Adicionalmente, al llegar la señal inflamatoria al hipotálamo, se activa el eje HPA y se liberan glucocorticoides, hormona con funciones inmunosupresoras, de la glándula adrenal. OSC: órgano subcomisural. OSF: órgano subfornical. GP: glándula pineal. OVLT: órgano vasculoso de la lámina terminal. EM: eminencia media. PP: Pituitaria posterior. AP: área postrema.

### **3.2 Interacciones entre el sistema inmune y el circadiano.**

Tal como se ha explicitado, el SNC y el sistema inmune se encuentran en una constante comunicación, y sus interacciones son muy importantes tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Teniendo en cuenta que el sistema circadiano es el responsable de la sincronización temporal de los procesos fisiológicos en general, no es absurdo pensar que puede controlar o modular a otros sistemas, como el inmune o el endocrino. En principio, la experiencia nos indica que el sistema inmune interactúa con el circadiano. Cuando nos sentimos enfermos tenemos el sueño alterado, o podemos tener picos periódicos de fiebre que aumentan en determinadas horas del día.

Los signos y síntomas de muchas enfermedades varían a lo largo del día. Por ejemplo, como se explica en profundidad en el Anexo de esta tesis, los ataques de asma son más comunes entre la medianoche y las seis de la mañana; o los ataques cardíacos entre las siete de la mañana y el mediodía (Golombek 2007). Como ya se mencionó, también se sabe que existe una relación entre determinadas moléculas inmunes y el ciclo de sueño-vigilia. Existen evidencias de que algunas citoquinas, como IL-1 y TNF- $\alpha$  son inductoras del sueño. Asimismo, los disturbios o la falta de sueño afectan los mecanismos de defensa del huésped, haciéndolo más susceptible a las infecciones (Irwin 2002; Krueger 2008; Bollinger 2010).

Estas evidencias, entre otras, llevaron a que, en estos últimos 20 años, se profundice el estudio de los mecanismos de interacción bidireccional inmune-circadianos. El estudio de esta interacción no solamente es importante para conocer los mecanismos subyacentes a cada patología, sino que también es de

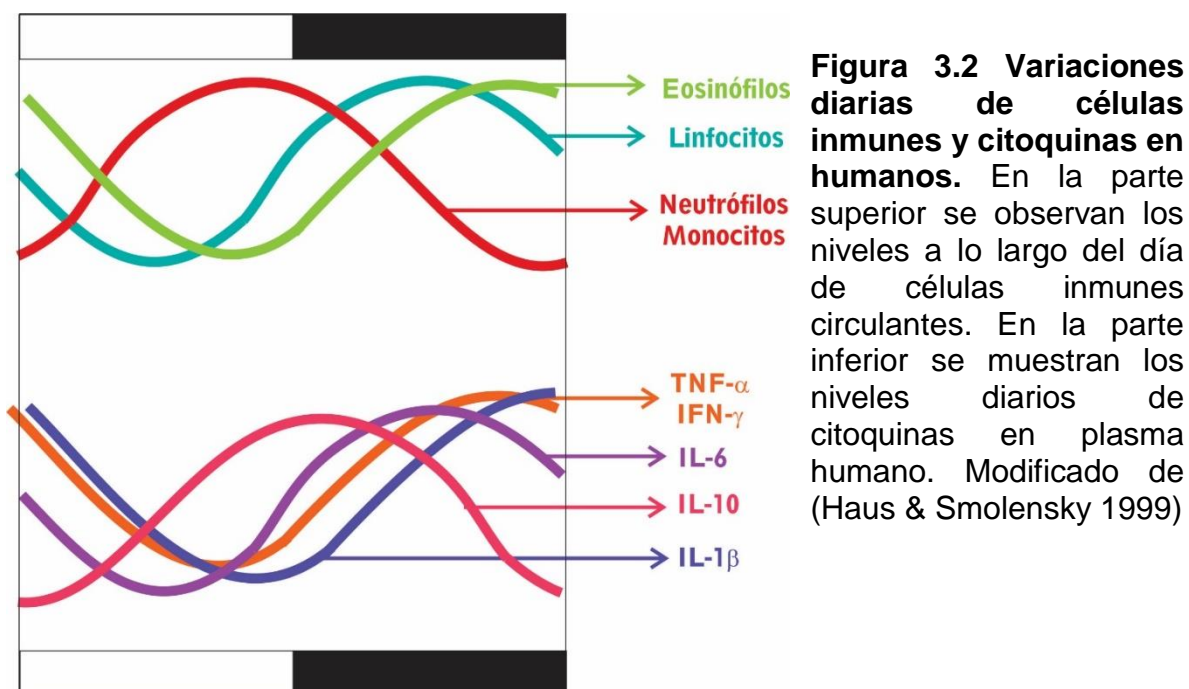
suma importancia para el desarrollo de terapias que se basen en las diferencias circadianas existentes en factores relacionados a la enfermedad. Basándose en estos conceptos se desarrolló la cronofarmacología, una rama de la cronobiología que busca incrementar la eficiencia de las terapias farmacológicas, administrando los fármacos en los momentos en que presentan mayor eficacia, y/o menores efectos adversos. Sin embargo, para el desarrollo de estas terapias cronomoduladas es preciso conocer los ritmos de las principales moléculas y funciones involucradas en la patogénesis de la enfermedad, y cómo estas moléculas, además, pueden afectar al sistema circadiano.

### **3.2.1 Ritmos en el sistema inmune**

Hoy en día sabemos que el sistema circadiano es capaz de modular al sistema inmune. De esta forma, la respuesta a un estímulo inmune puede variar a lo largo del día, probablemente debido a la existencia de ritmos en las funciones celulares o en la expresión de moléculas relacionadas con la inmunidad.

Ya en la década del 60, Halberg y colaboradores demostraron que existe una variación diaria en la susceptibilidad a dosis letales de LPS (mayor a 10 mg/kg) en ratones, ya que las inyecciones durante el día provocaron porcentajes de mortalidad mucho mayores que durante la noche (modelo que estudiaremos en el Capítulo II de este trabajo de tesis (Halberg 1960). Más tarde, varios estudios dieron indicios de regulación circadiana sobre tipos celulares y tejidos de origen inmune. Se ha observado que el número de linfocitos T y B, monocitos, macrófagos, células NK, neutrófilos y eosinófilos en sangre varía a lo largo del día en humanos y roedores (Abo 1981; Born 1997; Haus & Smolensky 1999;

Lange 2010). Como se muestra en la Figura 3.2, los niveles de eosinófilos y linfocitos circulantes en humanos, son mayores durante el final de la noche (etapa de reposo), mientras que los niveles de neutrófilos y monocitos son más altos hacia el final del día (Haus & Smolensky 1999). Por su parte, los niveles de IL-10 son mayores al comienzo de la noche, mientras que los de IL-6 tiene su pico a mitad de la noche y las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son mayores hacia el final de la noche (Petrovsky & Harrison 1997). La expresión y función de TLR9 también posee un ritmo circadiano (Silver 2012). Adicionalmente, se ha observado un ritmo en la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 en respuesta al LPS, en esplenocitos y macrófagos purificados de ratón, con un incremento en ambos casos hacia el final de la noche (Keller 2009). Asimismo, en estos animales se han observado mayores niveles de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  durante la noche en células NK de bazo (Arjona & Sarkar 2006). Por otro lado, se han encontrado ritmos en la expresión de genes reloj en linfocitos T CD4+ (Bollinger 2010), macrófagos (Boivin 2003; Hayashi 2007), células NK (Arjona & Sarkar 2006) y órganos linfoides (Keller 2009). Además, Keller y colaboradores (2009) encontraron que la expresión de aproximadamente el 8% del transcriptoma de los macrófagos oscila circadianamente. Por último, también se conoce que la microglía expresa genes reloj (Hayashi 2007), y que la expresión de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 es rítmica en éstas células, con un pico durante la mitad del día (Fonken 2015).



Asimismo, se encontró que muchas funciones inmunes fluctúan a lo largo del día. Por ejemplo, se observó que la expresión de moléculas de adhesión celular está controlada por el reloj circadiano (Sato 2014), y que existe una variación diaria en el reclutamiento de células inmunes a los tejidos, siendo más alto durante el principio de la noche (Scheiermann 2012). Adicionalmente, se encontró que el mecanismo de fagocitosis es mayor en la noche tardía en macrófagos peritoneales murinos (Hayashi 2007). También en ratones se observó que la inmunización durante el día provoca una respuesta más fuerte de células T CD8<sup>+</sup>, que en aquellos inmunizados en la noche (Fortier 2011).

Por lo tanto, todo parecería indicar que hay momentos del día en los cuales el sistema inmune se encuentra más activado, en un estado de inmunovigilancia (quizás anticipando los momentos de mayor riesgo de infección). Es por ello que alteraciones en la sincronización al ciclo ambiental afectan negativamente el funcionamiento del sistema inmune. En protocolos de desincronización circadiana, causados por cambios crónicos en el ciclo de LO

(JLC) o por lesiones de los NSQ, se observó, en varias oportunidades, una respuesta inflamatoria exacerbada en luego de la inoculación de LPS (Castanon-Cervantes 2010; Adams 2013; Guerrero-Vargas 2014; Phillips 2015).

Se postula que los NSQ serían quienes sincronizarían el sistema inmune a través de secreciones nerviosas o humorales, o indirectamente a través de variables comportamentales como el ciclo sueño-vigilia o el ritmo de actividad locomotora. Pero aún no se conocen las moléculas responsables de tal sincronización.

Las aferencias autonómicas a los órganos periféricos también están involucradas en esta comunicación. Tanto el sistema nervioso simpático como el parasimpático pueden llevar información desde los NSQ hacia los tejidos periféricos. Por ejemplo, el bazo recibe inervaciones del sistema simpático las cuales, a través de la liberación de noradrenalina, controlan los ritmos de citoquinas y de otras moléculas inmunes, en esplenocitos totales y células NK purificadas (Logan 2011). Adicionalmente, se ha descrito que la adrenalina controla los ritmos en el número de células T CD8<sup>+</sup> circulantes (Dimitrov 2009), y que el reclutamiento de leucocitos a distintos tejidos presenta oscilaciones circadianas, dependientes de inervaciones simpáticas adrenérgicas (Scheiermann 2012).

En cuanto a la vía humoral de sincronización del sistema inmune, el reloj circadiano posee un fuerte control sobre la secreción de la hormona melatonina (hormona secretada por la glándula pineal, inductora del sueño) y de los glucocorticoides. La administración de melatonina es capaz de modular la respuesta inflamatoria en distintos tejidos, ya sea aumentándola o disminuyéndola dependiendo del tejido o tipo celular que se evalúe (Carrillo-Vico

2005; Naidu 2010; Pinato 2015). Respecto a los glucocorticoides, ya hemos mencionado que poseen una potente función anti-inflamatoria, y que su secreción es modulada por el eje HPA. Dado que el reloj circadiano es capaz de modular al eje HPA, esta hormona es secretada rítmicamente (Buijs 1999; Lightman & Conway-Campbell 2010). La secreción rítmica de glucocorticoides tiene un rol importante en la sincronización de los relojes periféricos. Es por ello que la pérdida en la ritmicidad del eje HPA lleva a alteraciones en la respuesta inmune innata y adaptativa, como así también al desarrollo de ciertos tipos de cáncer en animales (Ben-Eliyahu 1999).

Por último, también existe evidencia de que los genes reloj pueden modular funciones inmunes en forma directa. Por un lado, se observó que el gen reloj *Clock* participa en la regulación circadiana de los niveles del factor inhibidor de los activadores de plasminógeno en las células sanguíneas *in vitro* (Oishi 2007), mientras que el gen *Per2* regula la secreción de INF- $\gamma$  de las células NK (Liu, J. 2006). Por otro lado, se demostró que la expresión de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6 está relacionada con el gen *Cry* (Hashiramoto 2010; Narasimamurthy 2012), mientras que *Bmal1* modula el ritmo diurno del número de monocitos inflamatorios (Nguyen 2013). Por su parte, *Rev-erva* suprime la expresión de la quemoquina CCL2 y de la citoquina IL6 en cultivos de macrófagos (Sato 2014).

### **3.2.2 Efectos del sistema inmune sobre el circadiano**

Es importante que también exista una retroalimentación desde el sistema inmune hacia el reloj, para que este último pueda censar lo que sucede en la periferia y de esta forma ajustar ciertas variables circadianas frente a un desafío que compromete al sistema.



En algunas enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoidea o la esclerosis múltiple, las cuales tienen un fuerte componente pro-inflamatorio, se encontró que tanto la expresión de algunos genes reloj como los ritmos de secreción hormonal, están alterados (Buenafe 2012; Kouri 2013).

En nuestro laboratorio se demostró que la activación inmune pro-inflamatoria puede modificar variables específicas del reloj biológico de ratones, modelo sobre el cual se desarrolla el Capítulo 1 de este trabajo de tesis. La inyección intraperitoneal (ip) de dosis bajas de LPS (25-100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en la noche temprana (CT15) induce un retraso de fase en el ritmo de actividad locomotora, sin modificar la temperatura corporal, y además, inhibe la actividad locomotora durante el día de inoculación (Marpegan 2005), en forma dependiente de la presencia del receptor TLR-4 (Paladino 2010). Asimismo, la administración intracerebroventricular (icv) de las citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  induce el mismo retraso de fase. Sin embargo, solo el receptor soluble de TNF- $\alpha$ , y no el antagonista de IL-1 $\beta$ , puede bloquear este efecto (Leone 2012). Además, se ha demostrado la participación en los NSQ del factor de transcripción NF- $\kappa\text{B}$  en los retrasos de fase inducidos por LPS (Marpegan 2004). En los NSQ la expresión de NF- $\kappa\text{B}$  colocaliza con GFAP (*proteína fibrilar ácida glial*; marcador astrocitario), y su expresión resultó estimulada en respuesta a LPS, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  en cultivos de astrocitos purificados de los NSQ (Leone 2006).

Como ya se mencionó anteriormente, una de las vías de salida de los NSQ son los NPV, los cuales cumplen un rol muy importante en la regulación de las respuestas neuroendócrina y autónoma, a través de la secreción hormonal. Se ha observado que estos núcleos presentan una importante activación, al igual

que un aumento en la expresión del gen reloj *Per1*, en respuesta a estímulos inflamatorios (Takahashi 2001; Bienkowski & Rinaman 2008; Belevych 2010).

Adicionalmente, se han encontrado vinculaciones entre algunos genes reloj y citoquinas pro-inflamatorias. Una de las primeras evidencias del efecto de las citoquinas sobre los NSQ fue el descubrimiento de la presencia de receptores de IFN- $\gamma$  en los NSQ, donde se describió además un ritmo diario en su expresión (Lundkvist 1998). Posteriormente se demostró que el tratamiento de cultivos de neuronas de los NSQ con IFN- $\gamma$  es capaz de alterar los ritmos de actividad eléctrica, como así también los ritmos de expresión de *Per1* (Kwak 2008).

En cuanto a la expresión de genes reloj, se ha reportado que TNF- $\alpha$  es capaz de modular la expresión de los genes reloj *Per1*, *Per2*, *Cry1* y *Bmal1* y de genes controlados por el reloj, como *Dbp* (Cavadini 2007; Petrzilka 2009; Yoshida 2013; Yoshida 2018), mientras que IL-1 $\beta$  puede disminuir la expresión de *Per3* y *Dbp* (Cavadini 2007). Por otra parte, estudios de nuestro laboratorio también han demostrado que la administración de TNF- $\alpha$  induce cambios en el reloj circadiano de astrocitos de NSQ (Duhart 2013).

**Como se puede observar, existen múltiples evidencias del control del reloj circadiano sobre el sistema inmune, y otras que a su vez refuerzan la hipótesis de que el sistema circadiano puede responder al estímulo inmune, planteándose entonces un modelo de interacción bidireccional. Sin embargo, como el estudio de esta comunicación comenzó recientemente, aún no se conoce exactamente sus mecanismos ni mediadores. Se hipotetiza que las citoquinas pro-inflamatorias podrían ser posibles mediadores humorales de dicho efecto. Teniendo en cuenta los**

resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (desarrollados en profundidad en el Capítulo 1) que demostraron que TNF- $\alpha$  es capaz de alterar el funcionamiento del reloj circadiano, nuestra hipótesis es que esta citoquina específicamente tendría un rol fundamental en la interacción inmune-circadiana.

Es necesario estudiar esta interacción bidireccional en mayor profundidad, dadas las múltiples evidencias de la participación del sistema circadiano en el funcionamiento del sistema inmune y la patogénesis de muchas enfermedades. En este trabajo de tesis se estudiarán tanto los efectos de un estímulo inmune sobre el sistema circadiano, como así también la regulación del sistema circadiano sobre la respuesta inmune a una patología. En el Capítulo 1, estudiaremos los efectos sobre el reloj circadiano de un estímulo inmune agudo, como son las dosis bajas de LPS, las cuales se conoce que son capaces de inducir alteraciones sobre el sistema circadiano. En el Anexo, se utilizará un modelo de inflamación pulmonar crónica, para analizar las posibles alteraciones que ésta podría generar sobre el reloj. Por último, en el Capítulo 2, se estudiará cómo el sistema circadiano es capaz de modular distintas variables que participan de la respuesta al shock séptico, generando una diferencia en la mortalidad de acuerdo al horario en el que se induce dicha condición. En los tres modelos, se evaluará principalmente el rol de la citoquina TNF- $\alpha$  como principal mediador entre ambos sistemas, debido a la gran cantidad de evidencias existentes al respecto.



# **CAPÍTULO I**

**Interacción entre los  
sistemas circadiano e  
inmune.**

**El TNF- $\alpha$  como mediador.**



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **Hipótesis general:**

*Existe una interacción entre el sistema inmune y el circadiano, la cual se encuentra mediada por la citoquina TNF- $\alpha$  y su receptor TNFR1.*

## **Hipótesis específicas:**

- El TNF- $\alpha$  se induce en NSQ en respuesta al estímulo inmune periférico.
- La expresión del receptor de TNF- $\alpha$ , TNFR1, es rítmica en los NSQ.
- La estimulación inmune periférica induce la activación neuronal y la expresión de genes reloj en NSQ y NPV.
- Los ratones deficientes del receptor tipo 1 de TNF- $\alpha$  (TNFR1 KO) presentan diferencias en el patrón circadiano de actividad locomotora y en la respuesta circadiana al LPS con respecto a los ratones normales.

Por lo tanto el **objetivo general** del capítulo I de esta tesis es estudiar la interacción entre el sistema inmune y el circadiano, utilizando como herramienta un modelo de inflamación aguda, y evaluando específicamente la participación de la citoquina TNF- $\alpha$  y su receptor tipo 1.

## **Objetivos específicos:**

1. Evaluar la presencia de TNF- $\alpha$  y su receptor (TNFR1) en NSQ.
2. Evaluar la activación neuronal y la expresión de genes reloj en NSQ y NPV en respuesta al estímulo inmune.

3. Realizar la caracterización circadiana del patrón de actividad locomotora de los ratones deficientes del receptor tipo 1 de TNF- $\alpha$ .
4. Analizar la respuesta circadiana al LPS en ratones TNFR1 KO, tanto a nivel comportamental como molecular.



# **I.1 INTRODUCCIÓN**



### **I.1.1 La citoquina TNF- $\alpha$ como mediadora entre los sistemas inmune y circadiano**

Como ya se mencionó en la sección 3.2 de la Introducción general, la citoquina TNF- $\alpha$  sería uno de los posibles mediadores en la comunicación entre el sistema inmune y el circadiano. Además de sus ritmos de expresión en distintos tipos celulares en tejidos periféricos, también existen múltiples evidencias de su expresión en el SNC.

La expresión de TNF- $\alpha$  se ha documentado en distintas regiones del cerebro, e incluso con variaciones diarias en sus niveles de ARNm, siendo mayores al principio del día en hipotálamo, hipocampo y corteza cerebral (Floyd & Krueger 1997). Las células de la microglia, como así también los astrocitos y algunos tipos neuronales, pueden producir TNF- $\alpha$ , tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Ransohoff & Brown 2012). Asimismo, también se observó que los receptores TNFR1 y TNFR2 se expresan en diversas regiones cerebrales en distintas condiciones (Botchkina 1997; Sadki 2007; Camara 2015). En cuanto a condiciones patológicas, se ha evidenciado que sus niveles en cerebro se incrementan ante un estímulo inmune, como el LPS (Gatti & Bartfai 1993; Laye 1994), incluso cuando es administrado en dosis bajas incapaces de romper la BHE (Pitossi 1997).

Sadki y colaboradores han observado que la inyección icv de un cóctel de las citoquinas TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  estimula la expresión del gen cFos (marcador temprano de activación neuronal) en NSQ y NPV (Sadki 2007). Adicionalmente, el tratamiento crónico de ratones con TNF- $\alpha$  por vía subcutánea lleva a una

disminución de la amplitud de expresión de genes reloj en el hígado, y a una inhibición transitoria de los ritmos de actividad locomotora (Cavadini 2007).

Experimentos *in vitro* realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento con TNF- $\alpha$  altera la fase y amplitud de los ritmos de Per2 en cultivos de astrocitos de NSQ; y que el medio condicionado de estos cultivos es capaz de modular la expresión de genes reloj en fibroblastos y tejido de NSQ incubado *ex vivo* (Duhart 2013). Otros grupos han encontrado que las neuronas de los NSQ modifican sus patrones de actividad eléctrica en respuesta a TNF- $\alpha$ , siendo este efecto mediado por el óxido nítrico (Nygard 2009). Adicionalmente, se ha encontrado que el tratamiento de fibroblastos con TNF- $\alpha$  lleva primero a una inducción de *Per1* y *Per2*, a tiempos cortos, seguido de una disminución en la amplitud de los ritmos de estos y otros genes controlados por el reloj. Estos efectos estarían mediados por la vía de p38-MAPK, y dependen del receptor TNFR1 (Cavadini 2007; Petrzilka 2009).

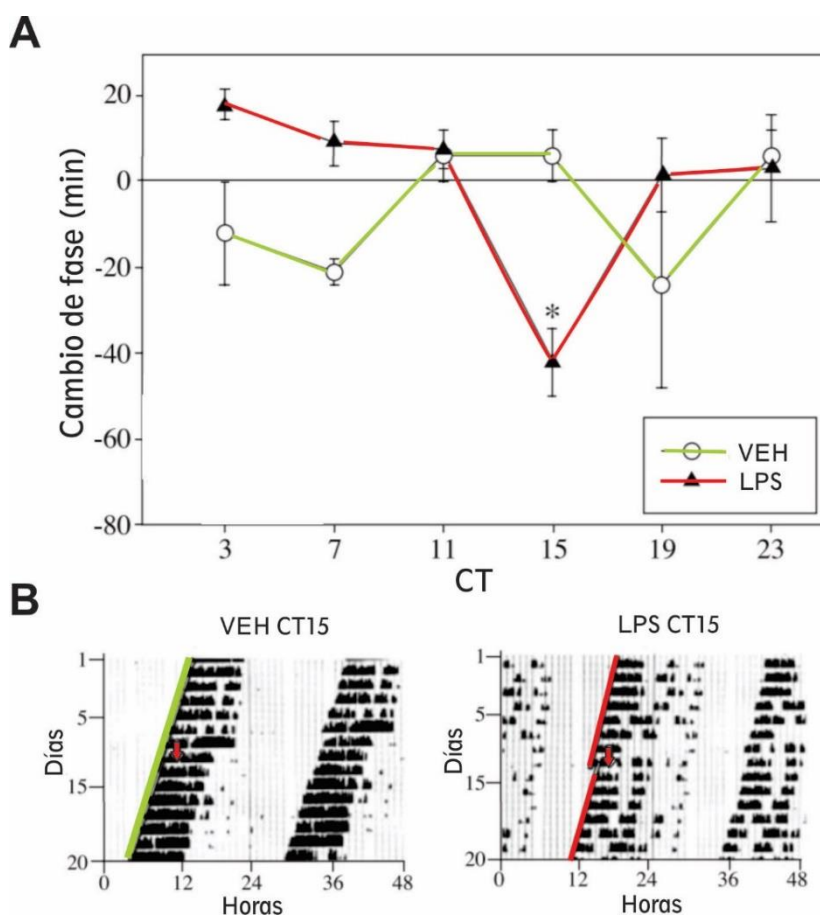
Por lo tanto, sabemos que TNF- $\alpha$  posee ritmos de expresión tanto a nivel central como periférico (Arjona & Sarkar 2006; Keller 2009; Fonken 2015), y que es capaz de modular la expresión de genes reloj (Cavadini 2007; Petrzilka 2009; Yoshida 2013; Yoshida 2018). **Sin embargo, aún no sabemos si esta citoquina es la encargada directa de comunicar ambos sistemas, desde la periferia hacia los NSQ y viceversa, ni cuáles son los mecanismos involucrados.**

### **I.1.2 El modelo de estudio: inoculación aguda de dosis bajas de LPS**

Como describimos anteriormente en la sección 2.3 de la Introducción general, el LPS es el principal componente de la pared de bacterias Gram negativas y es reconocido por el receptor TLR4 presente en distintos tipos celulares. Al activarse este receptor se desencadena una cascada de señalización que termina con la expresión de moléculas que participan de la respuesta inmune pro-inflamatoria, entre las cuales se encuentran diversas citoquinas y quemoquinas. Adicionalmente, en cuanto a los efectos sobre el SNC, como se describió en la sección 3.1.1 las citoquinas IL-1 y TNF- $\alpha$ , secretadas luego de la administración periférica de LPS, inducen fiebre y el típico comportamiento de enfermedad (Kluger 1991; Bryant 2004; Rockstrom 2018).

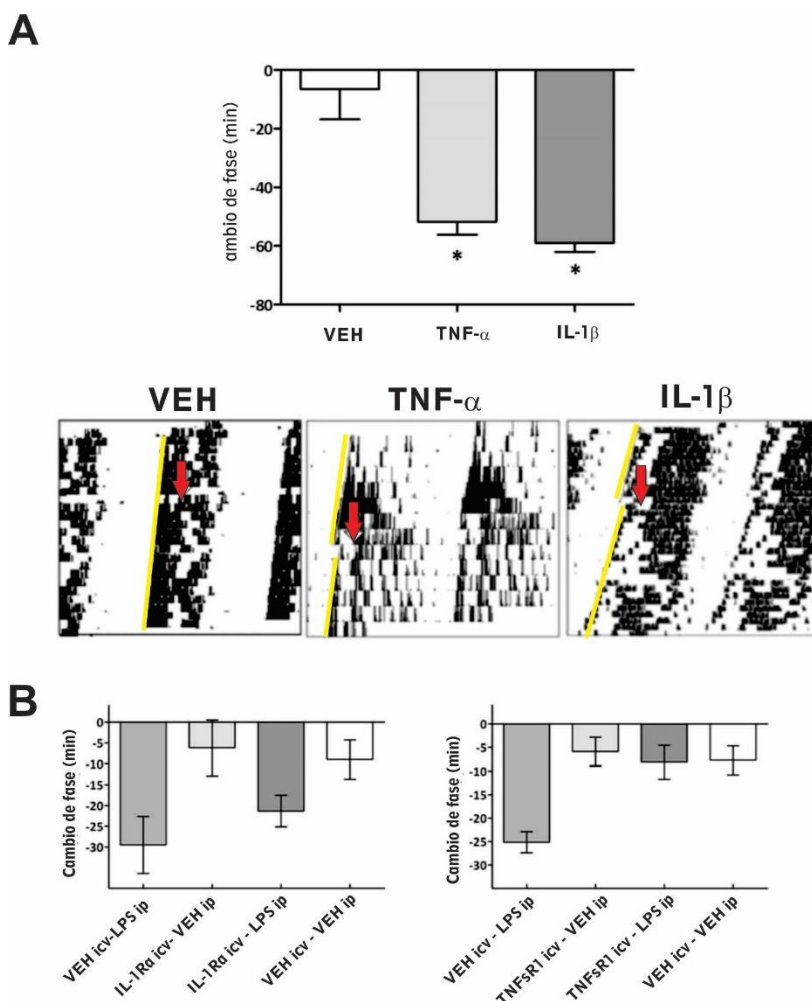
Desde hace ya varios años en nuestro laboratorio se utiliza la administración ip de dosis bajas de LPS (25-100  $\mu$ g/Kg) como modelo de estudio de los mecanismos moduladores que pueden ejercer componentes inmunes sobre el sistema circadiano. Este es un modelo de activación leve del sistema inmune, que no modifica la temperatura corporal. Como ya se mencionó anteriormente (sección 3.2.2), al administrar LPS en ratones mantenidos en oscuridad constante se observó una curva de respuesta de fase similar a la que se obtiene por efecto de la luz (Figura I.1.1 A), produciéndose retrasos en la fase del ritmo de actividad locomotora en rueda sólo cuando el LPS se administra al comienzo de la noche subjetiva, específicamente a CT15 (Figura I.1.1 B; (Marpegan 2005). Al analizar las posibles rutas de acción del LPS sobre el sistema circadiano, se observó que el estímulo es dependiente del receptor TLR4, ya que animales deficientes de los mismos no muestran cambios de fase

del ritmo comportamental ante la inoculación de LPS (Paladino 2010). Sin embargo, al estudiar los niveles séricos de citoquinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, se encontró que todas se inducían en respuesta al LPS, pero no se observaron diferencias de acuerdo al horario de administración (Leone 2012). Esto sugirió que el aumento de los niveles de citoquinas circulantes no sería suficiente para provocar un cambio en la fase del reloj circadiano. Por otro lado, también se evidenció una inducción del gen de activación neuronal cFos en los NSQ y NPV, 60 y 90 minutos después del estímulo con LPS (Marpegan 2005; Paladino 2010).



**Figura I.1.1 Cambio de fase del ritmo de actividad locomotora inducido por el LPS.** A) CRF del ritmo de actividad locomotora a dosis bajas (25  $\mu$ g/kg) de LPS (curva roja) o VEH (curva verde) administrado ip en ratones. B) Actogramas representativos del cambio de fase observado al administrar LPS o VEH a CT15. Modificado de (Marpegan 2005).

Otros estudios de nuestro laboratorio han demostrado que la inyección icv de IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  en la noche temprana induce el mismo retraso en la actividad locomotora que la inoculación ip de LPS; pero solo la administración icv del receptor soluble de TNF- $\alpha$  inhibe la acción periférica del LPS, efecto que no fue observado con el antagonista del receptor de IL-1 (Figura I.1.2, (Leone 2012).



**Figura I.1.2 Cambio de fase de la actividad locomotora inducido por la administración icv de citoquinas.** A) Cambio de fase de la actividad locomotora de ratones inducido por la administración icv de las citoquinas IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ ; junto con actogramas representativos. B) Cambio de fase observado en respuesta al tratamiento icv con el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) o el receptor soluble tipo 1 de TNF- $\alpha$  (TNFsR1), previo al tratamiento con dosis bajas (50  $\mu$ g/kg) de LPS o VEH por vía ip. Modificado de (Leone 2012).

Por lo tanto, hasta el momento sabemos que la administración de LPS periférico puede inducir la expresión de citoquinas en el SNC (responsables del comportamiento de enfermedad), y que además, esta endotoxina tiene efectos sobre el sistema circadiano induciendo un retraso en la fase del ritmo de actividad locomotora al administrarse al principio de la noche. Si se administra TNF- $\alpha$  por vía central, éste es capaz de inducir el mismo cambio de fase producido por el LPS, al igual que IL-1 $\beta$ , mientras que el receptor soluble de TNF- $\alpha$  puede inhibir este efecto. Como se puede apreciar, existe numerosa evidencia de que la citoquina TNF- $\alpha$  puede modular el funcionamiento del sistema circadiano, y, por lo tanto, es una de las principales candidatas como mediador inmune-circadiano. En este capítulo se estudiará el rol de esta citoquina en el cambio de fase del ritmo de actividad locomotora inducido por la administración periférica de bajas dosis de LPS.



# **I.2 MATERIALES Y**

# **METODOLOGÍA**



### **I.2.1 Animales y condiciones de alojamiento**

Se utilizaron ratones machos, de 2 meses de edad, C57-BL/6j (*Mus musculus*) *Wild Type* (WT) adquiridos en el Bioterio de la Universidad Nacional de La Plata, o criados en el Bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) y TNFR1 KO (*Knock Out* - carecen del gen TNFR1/p55 que codifica para el receptor tipo 1 de la citoquina TNF- $\alpha$ , C57-BL/6j - The Jackson Laboratory), criados en el bioterio de la UNQ. Dichos animales se mantuvieron bajo un fotoperiodo de LO12:12, a temperatura constante ( $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), con ventilación controlada y libre acceso a agua y alimento balanceado.

### **I.2.2 Registro de actividad locomotora**

Los animales se colocaron en jaulas individuales de acero inoxidable provistas de ruedas de locomoción con contactos magnéticos para la detección de actividad. La actividad locomotora se registró mediante el sistema de adquisición de datos Archron® versión 2.1, diseñado en el Laboratorio de Cronobiología de la UNQ.

#### **I.2.2.1 Análisis de datos de actividad locomotora**

Las series de datos en bins de 5 minutos se analizaron utilizando un programa de análisis para cronobiología denominado El Temps©, A. Díez Noguera, Universidad de Barcelona, España (para los cálculos del perfil de actividad y resincronización a un nuevo ciclo LO) o el programa Cloklab (para los cálculos de período y cambios de fase).

Evaluación de períodos: en condiciones de OO, los períodos de actividad en libre curso ( $\tau$ ) se determinaron utilizando periodogramas de 15 días consecutivos. Los periodogramas buscan periodicidad en la serie de datos de registro de la variable de interés, en este caso actividad locomotora. Como se explica en la sección 1.4.2, este análisis se realiza graficando en el eje X todos los posibles períodos que podría tener esa serie temporal (en el intervalo elegido) y en eje Y una variable relacionada con la potencia (amplitud) de cada posible período, de este modo los períodos significativos se observan como “picos” que sobrepasan la línea de significancia.

Análisis de la distribución de la actividad: se realizaron *waveforms* (gráficos de forma de onda) individuales utilizando 15 días consecutivos en condiciones de LO u OO. Dicho análisis consiste en graficar el promedio de actividad de los 15 días sucesivos en función de las horas del día. En condiciones de LO los mismos se realizan utilizando un período de 24 h, mientras que en OO se utiliza el período en libre curso correspondiente a cada animal. En condiciones de LO se analizó la actividad durante la fase de oscuridad, obteniéndose el dato de actividad total en dicha fase y porcentaje que esta representa respecto de la actividad total en las 24 horas (fase de luz más fase de oscuridad), para cada animal. En condiciones de OO, el *onset* (momento de inicio) de actividad se definió como el momento en el cual la curva de actividad supera el valor de actividad media en cada *waveform* individual (utilizando el correspondiente  $\tau$ ), en tanto que el *offset* (momento de finalización de la actividad) se define como el momento en el cual la curva comienza a tomar valores inferiores a la ésta. La duración de la noche subjetiva ( $\alpha$ ) se calculó midiendo el tiempo cubierto por la porción de la curva que sobrepasa la media de actividad, es decir desde el *onset*

hasta el *offset*. En tanto que, la duración del día subjetivo ( $\rho$ ), se calculó como el tiempo cubierto por la porción de la curva bajo la media de actividad. El porcentaje de actividad total durante  $\alpha$  y  $\rho$  se calculó como el porcentaje del área bajo la curva de la *waveform* durante el intervalo correspondiente. También se realizaron *waveforms* promedio de cada grupo de animales a partir de sus *waveforms* individuales a fin de observar las características generales de cada grupo.

Análisis de cambios de fase: se calcularon considerando 10 días antes y 10 días después del estímulo (pulso de luz o LPS ip), descartando los 2 días consecutivos posteriores al estímulo. El programa Clocklab define el *onset* de cada día y grafica la mejor recta que los une, luego compara la diferencia de fase entre la recta anterior y la posterior al estímulo. Por convención los retrasos de fase se analizarán como negativos, mientras que los adelantos como positivos.

Resincronización a un nuevo ciclo LO (*Jet-lag* agudo): para calcular los días necesarios para la resincronización al nuevo ciclo de LO, se realizaron adelantos o retrasos de 6 horas en el encendido y apagado de las luces (solo un día). Se consideró que el animal estaba sincronizado al nuevo ciclo LO el día en el cual el *onset* de actividad alcanzó la nueva hora de apagado de luces  $\pm 15$  minutos. En el caso del *jet-lag* por retraso los días de resincronización se calcularon también teniendo en cuenta la resincronización del *offset* mediante el registro del día a partir del cual el mismo se volvía estable. Los datos mencionados se reportaron como el número de días necesarios para la resincronización para cada animal.

### **I.2.3 Chequeo de la presencia de la mutación en los animales TNFR1 KO**

#### **I.2.3.1 Extracción de DNA a partir de tejido**

Los animales WT y TNFR1 KO fueron anestesiados por inhalación de Isoflurano y se cortó aproximadamente 0,5 cm de la cola. Las mismas se colocaron en 500 µl de buffer de extracción (50 mM Tris pH 7,6, 100 mM EDTA pH8, 100 mM NaCl y 1% SDS). Luego, se adicionaron 35 µl de Proteinasa K (PB-L, Productos Bio-Lógicos) 10 mg/ml diluido en buffer de extracción, y se incubó overnight a 55°C. A continuación se agregaron 200 µl de buffer de extracción, y luego, 700 µl de una mezcla fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). Se mezcló con vortex brevemente y centrifugó 10 minutos a 14000 r.p.m. Se separó la fase acuosa y nuevamente, se agregaron 600 µl de la mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se centrifugó 10 minutos a 14000 r.p.m. y volvió a separar la fase acuosa. Se agregó 1 ml de isopropanol frío y se centrifugó durante 7 minutos a 14000 r.p.m. Luego, se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con Etanol 70% frío y se centrifugó 5 minutos a 14000 r.p.m. A continuación se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a 37°C. Finalmente, se agregaron 100 µl de agua destilada estéril y se incubó a 95°C por 5 minutos. El DNA obtenido se cuantificó por fluorimetría utilizando el Kit Qubit™ (Invitrogen).

#### **I.2.3.2 Confirmación de la presencia de la mutación en los animales TNFR1 KO**

Los animales TNFR1 KO poseen un cassette de neomicina en la posición 535 de la secuencia codificante de dicho receptor que da lugar a una proteína no funcional. La presencia de dicha sustitución se corroboró mediante amplificación

por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir del DNA genómico obtenido de la cola del ratón. Se utilizaron los oligonucleótidos: o1MR448, 5`-TGT GAA AAG GGC ACC TTT ACG GC-3` (TNFR1 *oligonucleótido* WT); o1MR449, 5`-GGC TGC AGT CCA GCG ACT GG-3` (TNFR1 *oligonucleótido* común); y o1MR450, 5`-ATT CGC CAA TGA CAA GAC GCT GG-3` (*oligonucleótido* TNFR1 KO). Los oligonucleótidos o1MR448 y o1MR449 generan un fragmento de 470 pares de bases (pb) en los animales WT en tanto que o1MR449 y o1MR450 dan un fragmento de 300 pb en los ratones TNFR1 KO. Como gen de referencia se utilizó Actina, cuyos oligonucleótidos son: Actina-F: 5'-CTA TTG GCA ACG AGC GGT TC-3' y Actina-R: 5'-GCA-CTG-TGT-TGG-CAT-AGA-GG-3'. La mezcla de reacción utilizada en la PCR contenía buffer 1X (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM (Invitrogen), desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTP's) 0.2 mM (Invitrogen), oligonucleótidos sentido y antisentido descriptos previamente 0.6 µM para TNFR1 y 0.5 µM para Actina (sintetizados por Invitrogen), y 1 unidad de Taq Polimerasa (Invitrogen). El ciclado utilizado fue de 2 minutos a 94°C, 30 ciclos de 20 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 30 segundos a 72°C, y por último, 2 minutos a 72°C. Los productos obtenidos de esta reacción se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

#### **I.2.4 Análisis de los niveles de citoquinas/quemoquinas en tejido hipotalámico**

##### **I.2.4.1 Extracción de proteínas de tejido**

Los animales fueron inyectados ip con LPS (100 µg/kg; Escherichia coli serotipo 0111:B4 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o vehículo (VEH, solución

fisiológica) a ZT15 o ZT3 y fueron sacrificados por dislocación cervical 2 horas después (ZT17). Como se explicó en la sección 1.4 de la Introducción general, en animales en condiciones de LO se considera como ZT0 el momento de encendido de las luces y ZT12 el momento de apagado de éstas.

Se extrajo el cerebro de cada animal, se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 min y luego se cortaron con bisturí los NSQ y NPV bajo la lupa teniendo en cuenta las coordenadas del atlas de cerebro de ratón Paxinos, 2001. Para cada determinación ( $n=1$ ) se juntó el tejido correspondiente a 5 NSQ/NPV.

Los tejidos fueron colocados en *buffer* fosfato salina (PBS) 0.01M (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7.4) conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas (P8340- Sigma Aldrich) en una dilución 1/100. Luego, se homogenizó la muestra utilizando un vástago y se colocó 15 minutos en hielo. A continuación se centrifugó durante 15 minutos a 12000 r.p.m., se separó el sobrenadante y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **I.2.4.2 Cuantificación de citoquinas/quemoquinas por Citometría de Flujo**

Para realizar la determinación de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-10, y la quemoquina CCL2 (MCP-1) en las muestras de proteínas recolectadas se utilizó un Kit para medición de citoquinas de ratón (Citometric Bead Array Mouse Inflammation Kit- Becton, Dickinson and Company). El mismo contiene *beads* conjugadas a los anticuerpos de captura que reconocen las moléculas mencionadas, cada una de las cuales posee una intensidad diferente para el fluorocromo PerCP-Cy5. El sistema de detección que provee del Kit consta de anticuerpos específicos para cada una de dichas moléculas conjugados a ficoeritrina (PE). Se generaron las correspondientes curvas de



calibración, realizando diluciones de las soluciones de citoquinas/quemoquina estándar que provee el kit en un rango de 20 a 5000 pg/ml. Para realizar la reacción se agregaron 50 µl de las *beads* de captura, 50 µl de la dilución estándar o de la muestra incógnita y 50 µl del reactivo de detección. Se incubaron los tubos durante 2 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz. A continuación, se adicionó 1 ml de *buffer* de lavado a cada tubo, se centrifugó a 200 g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Nuevamente se agregaron 300 µl de *buffer* de lavado, para resuspender el *pellet*. Por último se analizaron las muestras utilizando el Citómetro de Flujo BD FACSCalibur™ (Becton, Dickinson and Company).

#### **I.2.4.3 Análisis de los datos**

Los datos fueron analizados con el programa FCAP Array (Becton, Dickinson and Company). Brevemente, se discriminó entre las distintas intensidades de cada *bead* (asociadas a cada analito), según la fluorescencia en el FL3 (PerCP-Cy5), y, a partir de las intensidades en el FL2 (PE) de las diferentes diluciones de los estándares correspondientes, se construyeron las curvas de calibración ajustando a un modelo de 4 parámetros (no lineal) para cada analito:

$$Y = ((A-D)/(1+(x/C)^B)) + D$$

Donde:

x = concentración del patrón

y = intensidad media de fluorescencia en FL2

A = valor de y en la asíntota a valores bajos de x

B = pendiente

C = punto medio entre A y D

D = valor de y en la asíntota a valores altos de x

Utilizando este ajuste se calculó la concentración de cada analito para cada muestra a partir de los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) en FL2 de la nube de *beads* correspondiente.

## **I.2.5 Análisis de los niveles del receptor tipo 1 de TNF- $\alpha$ en NSQ**

### **I.2.5.1 Extracción de ARN de tejido**

Los animales fueron sacrificados en diferentes horarios (ZT3, 7, 11, 15, 19 y 23) y el tejido correspondiente a los NSQ (identificado como se indica en la sección I.2.4.1) se recolectó en 100  $\mu$ l solución *Trizol*<sup>®</sup> (*Life Technologies*), en condiciones libres de RNAsas. Este se homogeneizó en dicha solución y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se le agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo frío por ml de *Trizol*<sup>®</sup>, se agitó e incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo estéril. Se agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol frío (por ml de *Trizol*), se mezcló y se incubó *overnight* a -80°C. Luego, se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4°C para obtener el *pellet* de ARN. Se removió el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 1 ml de Etanol 75% frío (por ml de *Trizol*), se mezcló y centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Se dejó secar el *pellet* durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se resuspendió en 15  $\mu$ l de agua destilada estéril. Las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría utilizando el equipo *NanoDrop1000* (*Thermo Scientific*). Se sintetizó el ADNc a partir de 200 ng de ARN total

utilizando el kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen)* con oligonucleótidos OligodT siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **I.2.5.2 PCR en Tiempo Real**

Con las muestras de ADNc se realizó una *Real-Time* PCR utilizando el equipo *Step One Plus (Applied Biosystems)* y la mezcla de reacción *Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)*. Para la normalización se utilizó el gen *Gapdh*. Los oligonucleótidos utilizados fueron: TNFR1-F 5'-ACC AAG TGC CAC AAA GGA AC-3', TNFR1-R 5'-ATT CTG GGA AGC CGT AAA GG-3', GAPDH-F 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA G-3' y GAPDH-R 5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTT C-3', en una concentración final de 400 nM; con los cuales se obtienen productos de 105 pb y 177 pb, respectivamente. Cada muestra de cDNA se analizó por duplicado, utilizando las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto. Por último, se obtuvo la curva de *melting* entre los 60 y 95°C.

Para el análisis de datos se fijó como CT calibrador el correspondiente al horario ZT3. La muestra utilizada como calibrador puede ser cualquiera y representa la unidad de cambio de la expresión y es utilizada para la comparación. La expresión génica se analizó utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando *Gapdh* como gen de referencia.

## **I.2.6 Análisis de los niveles de las proteínas cFos, PER1 y PER2 por inmunomarcación en NSQ**

### **I.2.6.1 Perfusión**

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilacina (150 y 10 mg/kg, respectivamente). Una vez perdidos los reflejos, se realizó una incisión longitudinal en la pared abdominal y se cortó el diafragma ganando acceso al corazón. Se realizó una incisión en la aurícula derecha y se colocó una aguja en el ventrículo izquierdo por la que se pasó PBS 0,01M, y luego fijador (paraformaldehído 4% en PBS 0,1 M a pH 7,4) fríos. Posteriormente, los cerebros se disectaron y post-fijaron por 12 horas en la misma solución fijadora a 4°C. Luego se transfirieron a una solución criopreservante de sacarosa al 30% en PBS 0,01M, hasta que se hundieron completamente en dicha solución. Por último, se congelaron a -80°C para su posterior utilización.

### **I.2.6.2 Inmunohistoquímica para cFos y PER1**

Para analizar la expresión de cFos, se utilizaron los cerebros extraídos 15, 30, 60, 90 o 240 minutos después de la administración ip a ZT3 o ZT15 de 100 µg/kg de LPS o VEH. Estos cerebros no fueron perfundidos, solamente se los post-fijó y deshidrató con sacarosa (como se explica en la sección I.1.6.1). Para el estudio de la expresión de PER1, los animales fueron perfundidos 90 minutos después del estímulo (como se desarrolló en la sección I.1.6.1). En ambos casos se obtuvieron cortes de cerebro en secciones coronales de 30 µm, utilizando un criostato por congelación. Estos cortes fueron lavados 2 veces por 10 minutos con PBS 0.01 M y 3 veces por 15 min con PBS Tritón-X100 0.4% (PBST), antes de incubarlos por 1 hora con la solución de bloqueo (leche descremada al 10%

en PBST). Finalizado el bloqueo, los cortes se lavaron 3 veces con PBST por 10 min e incubaron con el anticuerpo primario (anti-cFos hecho en conejo - *Santa Cruz*, en una concentración de 1:4000 en PBST o anti-PER1 hecho en conejo – *Affinity BioReagents*, en una concentración de 1:600 en PBST), por 48hs a 4°C. Posteriormente se lavaron 4 veces por 10 min con PBST e incubaron con un anticuerpo secundario universal biotinilado en una concentración de 1:200 en PBST (*Kit ABC elite, Vector Labs*), durante 90 minutos. Luego de lavar nuevamente con PBST, se transfirieron a PBS e incubaron con la solución de bloqueo de la peroxidasa endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en PBS) por 30 minutos. A continuación se realizaron 3 lavados con PBS y se incubó con al complejo avidina/biotina-peroxidasa (*Kit ABC elite, Vector Labs*) en PBS durante 1 hora. Para visualizar la inmunoreactividad por reacción de la enzima peroxidasa se utilizó el sustrato VIP (*Vector Labs*) en PBS. Luego, los cortes fueron montados en vidrios cargados positivamente, secados y deshidratados por incubación durante 30 segundos en soluciones de alcoholes de concentración creciente (Etanol 70%, 96% y 100%) y en sustituto de xileno (*Biopack*) durante 1 minuto. El cubreobjetos se colocó con medio de montaje sintético (Bálsamo de Canadá - *Biopack*).

### **I.2.6.3 Inmunofluorescencia para PER2**

Los animales fueron inyectados ip con LPS (100 µg/kg) o vehículo a ZT15, y perfundidos 2 horas 30 minutos después del estímulo. Se obtuvieron cortes coronales de cerebro de 20 µm utilizando un criostato por congelación, los cuales fueron lavados 2 veces durante 5 minutos en *buffer* fosfato 0,1M (PB), luego 2 veces durante 10 minutos en PB con Tritón X-100 al 0.03% (PB-T 0,03%), 2

veces durante 10 minutos con PB con Tritón X-100 al 0.3% (PB-T 0,3%) y por último, 2 veces durante 10 minutos con PB-T 0.03%. A continuación se realizó el bloqueo de los cortes con PB-T 0.03% con leche descremada al 10%, durante 1 hora, y se lo incubó con el anticuerpo primario anti-PER2 hecho en conejo (*Alpha Diagnostics*) en una concentración 1:2000 en PB-T 0.03%, durante 72 horas a 4°C. Luego, se los incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se le realizaron nuevamente 3 lavados de 10 minutos con PB-T 0.03%, 3 lavados con PB-T 0,3% de 10 minutos, y por último, 3 lavados con PB-T 0.03% de 10 minutos. A continuación, se los incubó con el anticuerpo secundario conjugado con isotiosianato de fluoresceína (FITC, Vextor Laboratorios, Burlingame, CA) en una concentración de 1:200 en PB-T 0.03%, durante 1 hora a 37°C. Se realizaron 2 lavados con PB-T 0.03% durante 10 minutos, 1 lavado con PB-T 0.3% durante 10 minutos y un último lavado de 10 minutos con PB-T 0.03%. Finalmente, se montaron los cortes en portaobjetos positivados y se les colocó un cubreobjetos con medio de montaje conteniendo DAPI (Vectashield® - *Vector Labs*). Los portaobjetos fueron almacenados a 4°C, en oscuridad.

#### **I.2.6.4 Cuantificación de células positivas para cFos, PER1 y PER2**

Se obtuvieron fotografías de los cortes de cerebro tratados por inmunohistoquímica/inmunofluorescencia utilizando un microscopio de fluorescencia acoplado a una cámara fotográfica. Se eligieron aproximadamente 4 fotografías de cortes correspondientes a la zona media, en el sentido antero-posterior, de los NSQ y de los NPV de cada cerebro y se analizaron utilizando el programa ImageJ (NIH). Se definieron regiones ajustadas a las regiones

anatómicas de *Core* y *Shell* de los NSQ y a los NPV, y se contó el número de células marcadas mediante la herramienta “Cell counter” del software.

En los casos en los cuales no era posible técnicamente realizar la inmunomarcación de tantos cerebros en paralelo, se repitió dos veces cada experimento. Los valores obtenidos fueron relativizados al promedio del VEH de cada horario, y luego se juntaron los experimentos y promediaron los valores relativizados.

### **I.2.7 Análisis estadísticos utilizados**

Se emplearon pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas como ANOVA a dos vías o Kruskal Wallis para las comparaciones grupales, y prueba t de Student o U de Mann-Witney para las comparaciones entre controles y tratamientos. En el caso de que resultara significativo el ANOVA a dos vías, se utilizó a posteriori el Test de Bonferroni, mientras que en el caso de haber utilizado Kruskal Wallis, se utilizó como post-test el Test de Dunn's. Las pruebas paramétricas solo fueron utilizadas para aquellos datos que pasaron la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la de homocedacea. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad InStat 5 o Infostat. Las estadísticas completas se muestran en la leyenda de las figuras correspondientes. Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM).





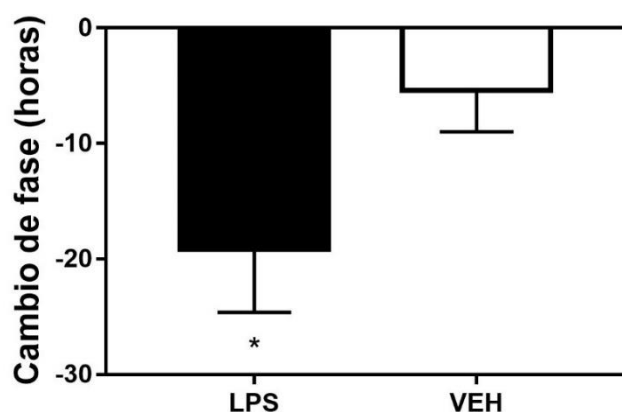
## **I.3 RESULTADOS**



### **I.3.1 Respuesta circadiana a la administración de LPS a CT15**

#### **I.3.1.1 Cambio de fase del ritmo de actividad locomotora**

Como se menciona previamente, ha sido previamente reportado que la administración ip de dosis bajas de LPS a CT15 induce un retraso de fase del ritmo de actividad locomotora de aproximadamente 20-30 minutos, en animales WT junto un período de inactividad de 9 horas a partir de la inoculación (es decir, entre CT15 y CT24) (Marpegan 2005; Paladino 2010). Para poder trabajar con este modelo, primero se replicó este fenómeno. Como se observa en la Figura I.3.1 la inoculación ip de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS indujo un retraso de fase de  $19.20 \pm 5.4$  minutos, el cual fue significativamente distinto al observado en los animales inyectados con VEH ( $p=0.0425$ ).



**Figura I.3.1 Cambio de fase de la actividad locomotora inducido por el LPS.** Se administró una dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS o VEH a ratones C57/BL6J. Se muestra la Media  $\pm$  EEM del cambio en la fase del ritmo de actividad locomotora observado en los días posteriores a la inoculación. Test de t,  $p=0.0425$ . ( $n=11$  para LPS y  $n=12$  para VEH).

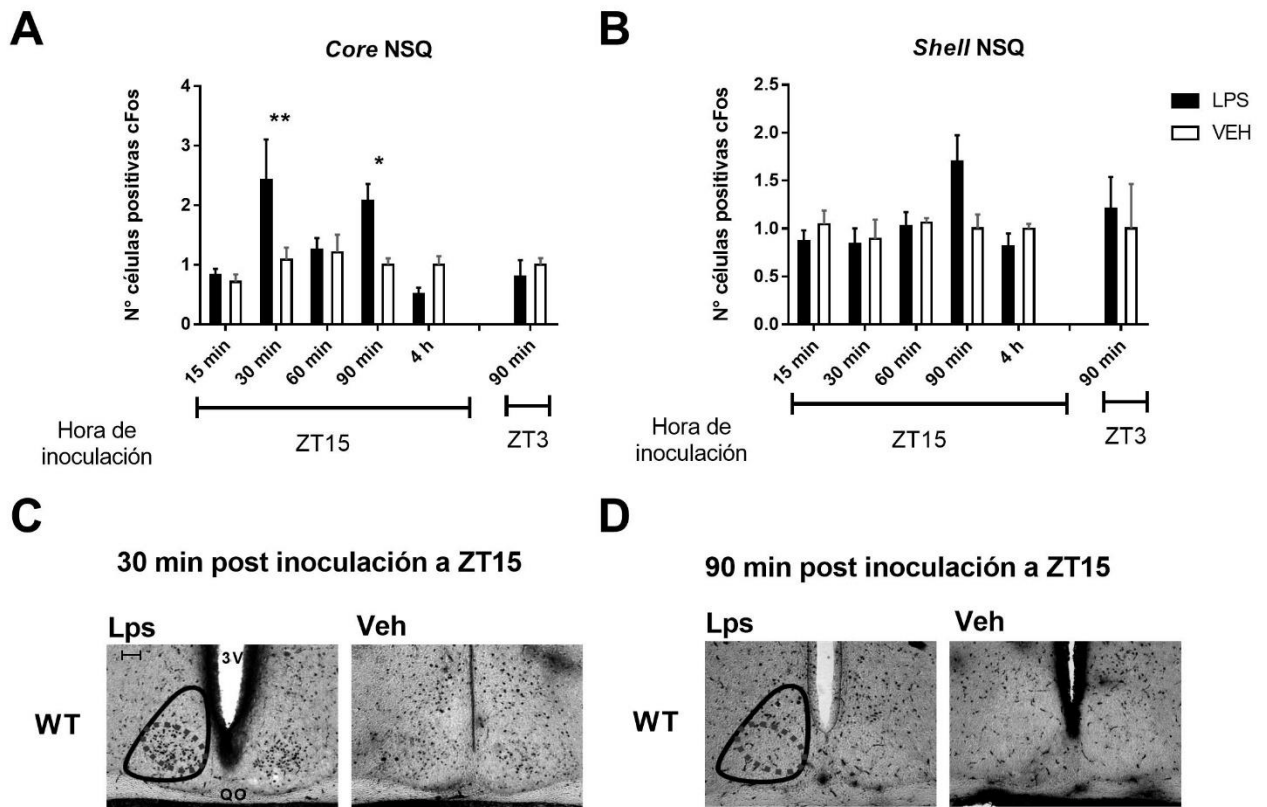
#### **I.3.1.2 Activación de las células de los NSQ y NPV en respuesta al LPS**

Como se explicó anteriormente, cFos es un gen de activación neuronal inmediatamente temprano. Los pulsos de luz en la noche temprana inducen la activación de cFos en los NSQ (Kornhauser 1996; Shuboni 2015). Dado que la administración de LPS a CT15 induce retrasos de fase, al igual que los pulsos de luz administrados en ese horario, y estimula la expresión de cFos en NPV a

los 90 minutos (Paladino 2010), se decidió estudiar el efecto de la endotoxina sobre la inducción de este gen en los NSQ y NPV a distintos intervalos de tiempo luego de su administración.

Este análisis se realizó en muestras de cerebro tomadas 15, 30, 60, 90 minutos o 4 horas después de la inoculación a ZT15, o 90 minutos después de la inoculación a ZT3, para analizar si en este horario se producía la activación de los NSQ y/o NPV.

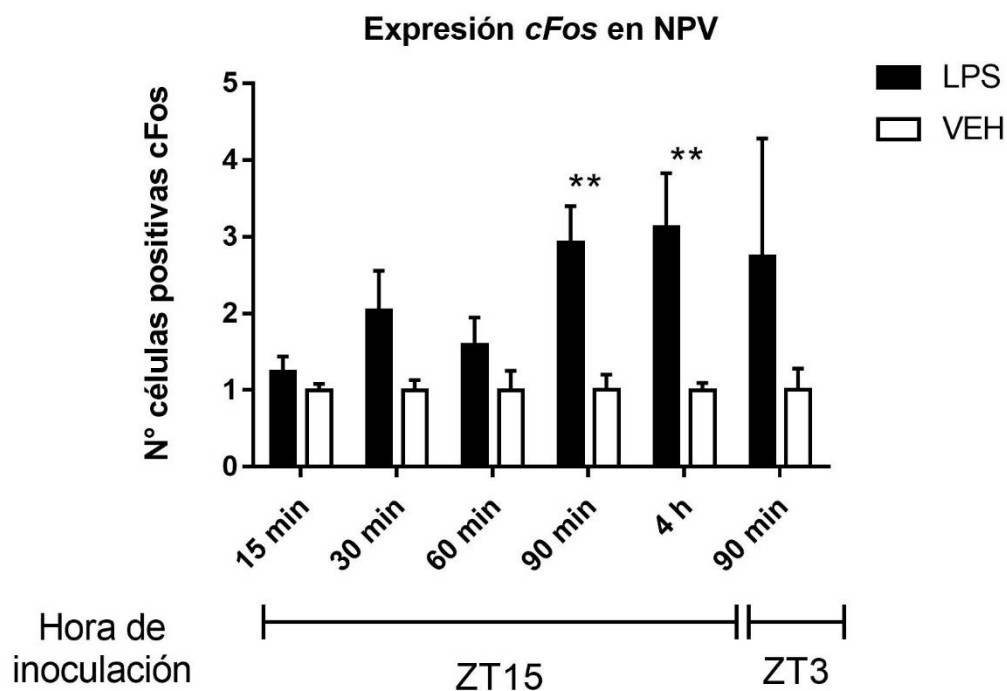
En la Figura I.3.2 A y B se muestran los resultados obtenidos para la inmunohistoquímica de cFos, donde se observa que la estimulación periférica con LPS a ZT15 produjo una inducción significativa de cFos en el *Core* de los NSQ, 30 y 90 minutos después de la inoculación ( $p=0.0017$ ). En la región *Shell*, solo se observa una tendencia al incremento en la activación a los 90 minutos que no llega a ser significativa, probablemente debido al diseño experimental que posee varias medidas repetidas en el tiempo. En la sección I.3.4.3 se muestran los resultados de otro experimento en el que también se midió cFos a los 90 minutos en *Shell*, donde la activación resultó significativa en los animales WT inoculados con LPS. En la parte C y D de la Figura I.3.2 se observan imágenes representativas de la inmunohistoquímica a 30 y 90 minutos después de la inoculación a ZT15.



**Figura I.3.2** **Immunohistoquímica de cFos en NSQ** de ratones inoculados con LPS (100 µg/kg, ip) o VEH en el horario ZT15 o ZT3. Las muestras se tomaron 15, 30, 60, 90 o 240 minutos (4h) luego de la inoculación a ZT15; y 90 minutos luego de la inoculación a ZT3. Media ± EEM del número de células positivas para cFos relativizadas al promedio de los VEH de cada experimento en **A)** la zona del *Core* de los NSQ y **B)** en el *Shell* de los NSQ. Imágenes representativas de las inmunohistoquímicas a 30 minutos (**C)** y 90 minutos (**D)** luego del estímulo inmune. 3V: tercer ventrículo. QO: quiasma óptico. Barra de escala=100 µm. La línea entera delimita el NSQ total, y la punteada la región del *Core*. A) ANOVA de dos vías: Factor tiempo p=0.0017, factor interacción p=0.0147, seguido por Test Bonferroni: \*\*p<0.01 LPS vs VEH a 30 min, \*p<0.05 LPS vs VEH a 90 min. C57-BL/6j WT n= 7 para 15 y 60 min LPS/VEH, 30 min VEH y 90 min LPS; n=6 para 30 min LPS, n=4 para 4h LPS/VEH y n= 2 para ZT3.

Como ya se mencionó previamente (sección 1.3.2 de la Introducción general), los NPV son núcleos cerebrales encargados, entre otras cosas, del control de diversas funciones inmunes y, poseen aferencias provenientes de los NSQ. Dado que su activación luego de la inoculación periférica de LPS había sido previamente reportada (Marpegan 2005; Paladino 2010), se analizó su activación en nuestro modelo en los diferentes intervalos de tiempo. Como se observa en la Figura I.3.3, se observó un aumento significativo de la expresión

de cFos en los NPV 90 min y 4h después de la inoculación con LPS a ZT15 (p<0.0001).



**Figura I.3.3** Immunohistoquímica de cFos en NPV de ratones inoculados ip con LPS (100 µg/kg, ip) o VEH en el horario ZT15 o ZT3. Las muestras se tomaron 15, 30, 60, 90 o 240 minutos (4 h) luego de la inoculación a ZT15; y 90 minutos luego de la inoculación a ZT3. Se muestra la media + EEM del número de células positivas para cFos en NPV relativizadas al promedio de los VEH de cada experimento. ANOVA de 2 vías: factor tratamiento p<0.0001, seguido por test de Bonferroni: \*\*p<0.01 LPS vs VEH 90 min y 4h. C57-BL/6j WT: n= 7 para 15 y 60 min LPS/VEH, 30 min VEH y 90 min LPS; n=6 para 30 min LPS, n=4 para 4h LPS/VEH y n= 2 para ZT3.

### I.3.2 Componentes de la respuesta inflamatoria en NSQ y NPV

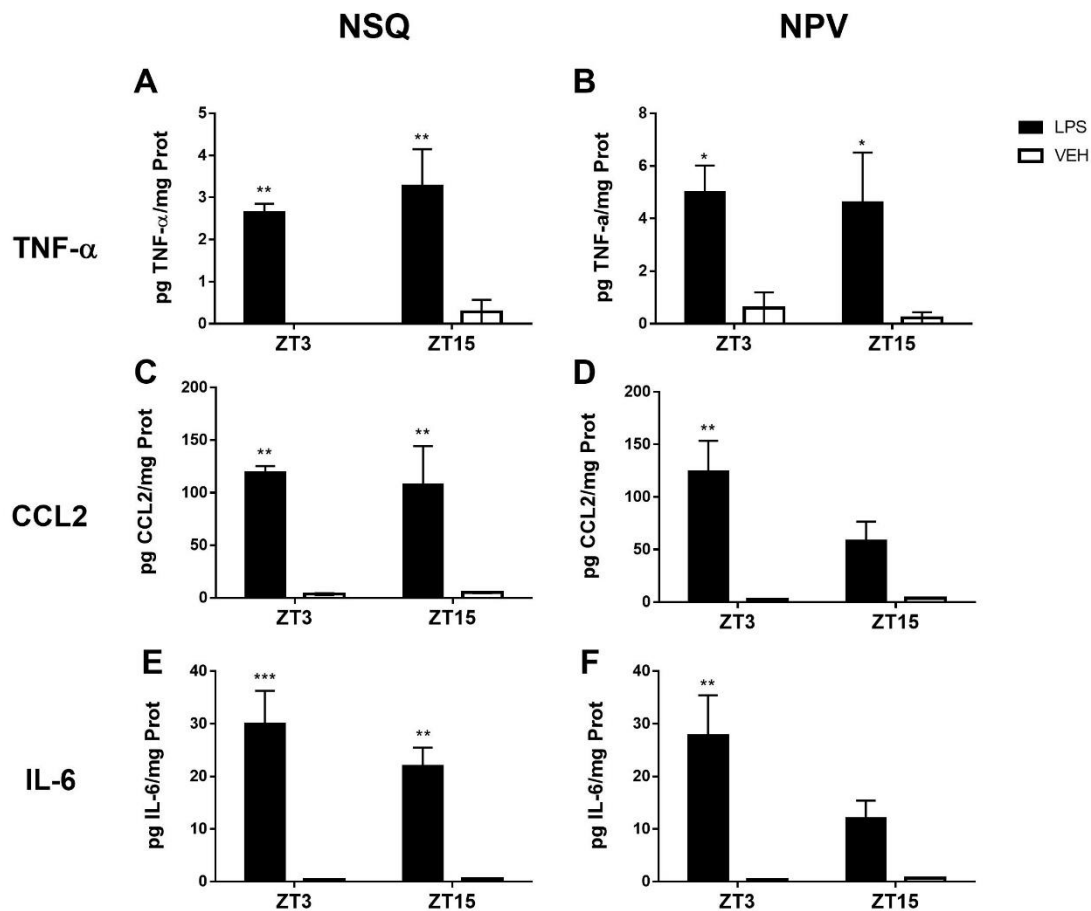
#### **I.3.2.1 Niveles de citoquinas/quemoquinas en los NSQ y NPV, inducidos por la estimulación inmune periférica**

Como se mencionó en la introducción de este capítulo (sección I.1.2), algunas citoquinas pro-inflamatorias, y en particular TNF- $\alpha$ , podrían ser las responsables de la comunicación entre los sistemas inmune y circadiano. Para

que dicha hipótesis se cumpla, tanto la citoquina como su receptor deberían estar presentes en los NSQ, al menos en el horario en el cual el estímulo inmune periférico induce un cambio circadiano.

Para comprobar la mencionada hipótesis, en primer lugar se realizó la inoculación aguda de dosis bajas de LPS a ZT15 y ZT3 y se evaluaron los niveles de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-10, y de la quemoquina CCL2 en los NSQ y NPV, 2 horas después, utilizando un kit comercial para la cuantificación de estas moléculas en ratón por Citometría de Flujo.

Se observó una inducción significativa de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6, y de la quemoquina CCL2 en ambos horarios y ambas regiones cerebrales; mientras que las citoquinas IL-12p70, IFN- $\gamma$  IL-10 no fueron detectables en ninguno de los casos evaluados. Estos resultados se muestran en la Figura I.3.4 (A:  $p=0,0003$ ; B:  $p=0,0045$ ; C:  $p=0,0001$ ; D:  $p=0,0016$ ; E:  $p=0,0004$ ; F:  $0,0008$ ). En NPV, solamente TNF- $\alpha$  se indujo significativamente en ambos horarios; mientras que IL-6 y CCL2 solo mostraron un incremento estadísticamente significativo a ZT3 (Figura I.3.4 B, D y F).



**Figura I.3.4 Análisis de los niveles de TNF- $\alpha$ , CCL2 e IL-6 en NSQ y NPV 2 horas después de la administración de LPS ip a ZT15 y ZT3.** Media  $\pm$  EEM de los niveles de TNF- $\alpha$  en **A)** NSQ y **B)** NPV; IL-6 en **C)** NSQ y **D)** NPV y CCL2 en **E)** NSQ y **F)** NPV. ANOVA de 2 vías: Factor tratamiento: A)  $p=0,0003$  B)  $p=0,0045$  C)  $p=0,0001$  D)  $p=0,0016$  E)  $p=0,0004$  F)  $0,0008$ ; seguido por test Bonferroni: LPS ZT3 vs VEH ZT3 y LPS ZT15 vs VEH ZT15: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ . IL-12p70, IFN- $\gamma$  e IL-10 no resultaron detectables en ninguno de los casos analizados.  $n=3$  para cada punto; cada  $n$  corresponde a un pool de NSQ de 5 animales.

### I.3.2.2 Niveles diarios del receptor tipo 1 de TNF- $\alpha$ en los NSQ

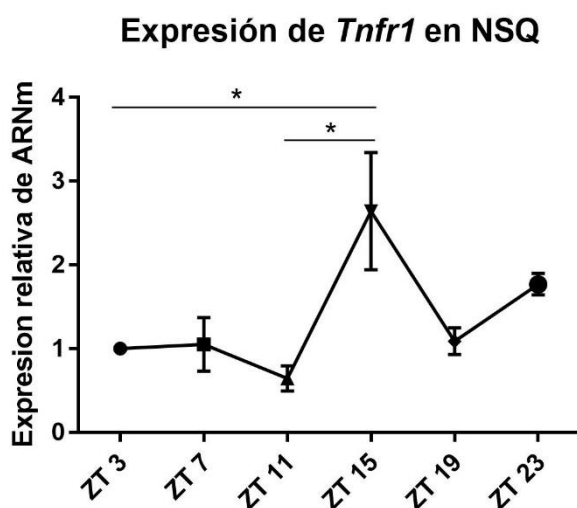
Como mencionamos previamente, para que se produzca la señalización de TNF- $\alpha$  sobre los NSQ, su receptor TNFR debería expresarse allí. Además, dado que observamos que la inoculación periférica de LPS induce un incremento en los niveles de las citoquinas en NSQ en ambos horarios, nos preguntamos si la



dependencia horaria del efecto circadiano observado podría deberse a que TNFR1 se exprese rítmicamente en estos núcleos.

A fin de evaluar el ritmo de expresión de TNFR1 en NSQ, se tomaron muestras de ratones WT cada 4 horas: a ZT3, 7, 11, 15, 19 y 23 de las cuales se extrajo el ARN para realizar una retrotranscripción y PCR en Tiempo Real.

Como se observa en la Figura I.3.5, la expresión de TNFR1 es más alta durante la noche, específicamente a ZT15, comparada con su expresión durante el día ( $p=0,0098$ ). Esto sugiere que este receptor posee una expresión rítmica en los NSQ, la cual podría generar una diferencia circadiana en la señalización por TNF- $\alpha$  en los NSQ.



**Figura I.3.5 Niveles de *Tnfr1* a ZT3, 7, 11, 15, 19 y 23 en los NSQ,** medida por RT y PCR en Tiempo Real. Las muestras fueron normalizadas al gen de referencia GAPDH. Se grafica Media  $\pm$  EEM. ANOVA de una vía:  $p=0,0098$ , seguido por Test de Bonferroni: \*  $p<0,05$  ZT3/ZT11 vs ZT15 C57-BL/6j WT:  $n= 4$  para cada punto.

### **I.3.3 Respuesta circadiana al LPS en ratones TNFR1 KO**

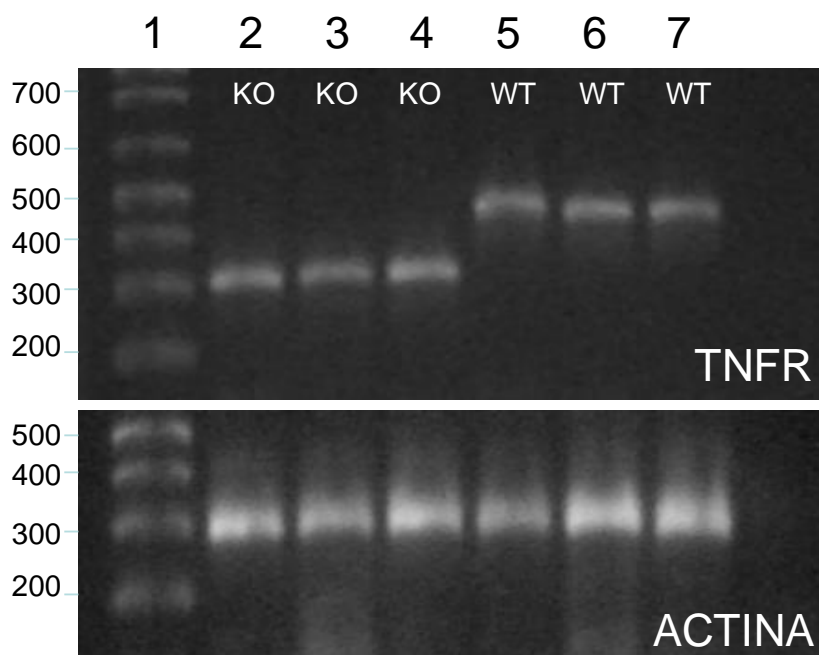
Los resultados anteriores en relación a TNF- $\alpha$  y su receptor TNFR1 en los NSQ, junto a los resultados previos de nuestro laboratorio y de otros grupos de investigación (ver sección I.1.2), son un fuerte indicio de la participación de esta citoquina en la comunicación inmune-circadiana. Por lo tanto, a fin de profundizar

en el estudio del rol de TNF- $\alpha$  en dicha interacción, se decidió estudiar la respuesta circadiana al LPS y caracterizar los ritmos de actividad comportamental en ratones que carecen del receptor tipo 1 de TNF- $\alpha$  (TNFR1 KO). Estos animales poseen insertado un *cassette* de neomicina en la secuencia codificante para este receptor, dando lugar a una proteína no funcional.

### **I.3.3.1 Confirmación de la presencia de la mutación en los animales TNFR1 KO**

En un principio se chequeó la presencia de la mutación en estos animales mediante una reacción de PCR que permite diferenciar los ratones WT de los TNFR1 KO.

En la Figura I.3.6 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa que se realizó con los productos obtenidos de la PCR realizada con las muestras de ADN genómico proveniente de animales WT y KO. Como se puede observar las muestras de los animales KO (calles 2, 3 y 4), dieron una banda del tamaño esperado (300 pb); en tanto que las muestras de los animales WT (calles 5, 6 y 7), que dieron una banda de aproximadamente 470 pb. Adicionalmente, se realizó una PCR del gen constitutivo Actina con las mismas muestras, obteniéndose los fragmentos esperados de 289 pb.



**Figura I.3.6 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la reacción de PCR para chequeo de la mutación en los animales TNFR1 KO.** Calle 1: Ladder 1Kb Plus (Invitrogen), calles 2, 3 y 4: productos provenientes de las muestras de animales KO; calles 5, 6 y 7: productos provenientes de las muestras de animales WT. En la parte superior se muestran los productos de la PCR para TNFR1 y en la parte inferior los productos de la reacción de PCR del gen actina, realizadas con las mismas muestras. El fragmento correspondiente a los animales KO es de 300pb, el correspondiente a los WT es de 470pb y el del gen actina de 289pb.

### I.3.3.2 Respuesta a la administración de LPS a CT15 en animales TNFR1 KO

Posteriormente se analizó si los animales TNFR1 KO respondían en forma circadiana al LPS. En la Figura I.3.7 A se observa que una dosis de 100 µg/kg de LPS en estos animales no produjo retraso de fase ( $-0.01 \pm 0.04\text{h} / 0.6 \pm 2.4$  min), a diferencia de lo sucedido con los animales WT ( $-0.32 \pm 0.09\text{h} / 19.2 \pm 5.4$  min;  $p=0.0073$ ).

La administración ip de dosis bajas de LPS a CT15 no solo induce retrasos de fase del ritmo de actividad locomotora en animales WT sino que también promueve un período de inactividad en lo que resta de esa noche, es decir, entre CT15 y CT24 (Marpegan 2005; Paladino 2010). Esta inhibición de la actividad locomotora en rueda sí se produjo inmediatamente después de la administración

de LPS en los animales TNFR1 KO (ANOVA de dos vías, factor tratamiento  $p=0.01$ ). En la Figura I.3.7 B, se muestra el porcentaje de actividad relativa luego de la inoculación con LPS o vehículo de los animales WT o KO.

Los cambios en la fase del ritmo de actividad locomotora en respuesta al estímulo inmune (presente solo en animales WT), así como la inhibición de la actividad en el día de la inoculación, se pueden observar en los actogramas representativos que se muestran en la Figura I.3.7 C.

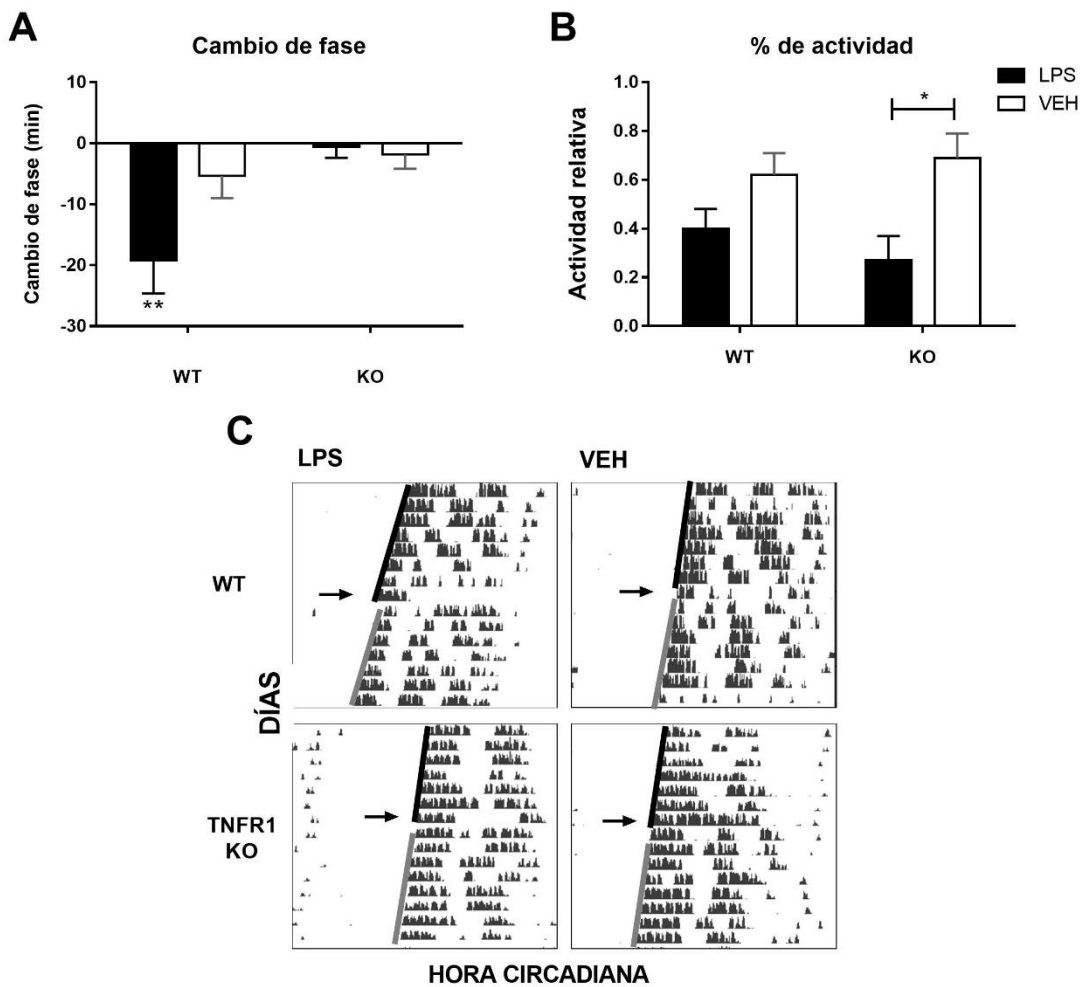
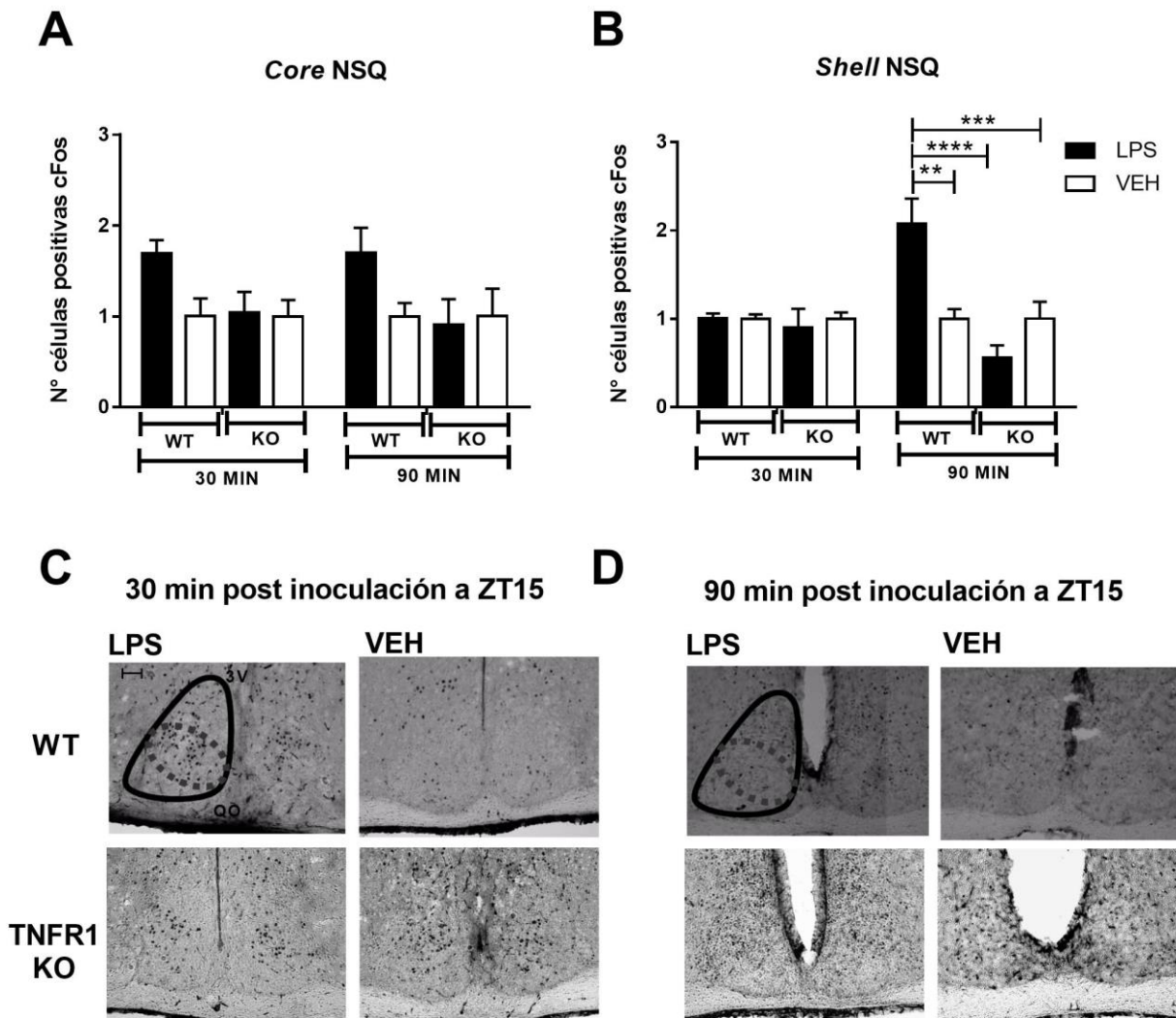


Figura I.3.7 Ver leyenda en la próxima página.

**Figura I.3.7 Efecto del LPS sobre la actividad locomotora de ratones TNFR1 KO.** Media  $\pm$  EEM **A)** del cambio de fase en horas inducido luego de la administración ip de LPS (100  $\mu$ g/kg) o VEH en animales WT o TNFR1 KO. **B)** Actividad relativa inmediatamente después de la inyección, entre CT15 y CT24 (actividad durante el día de inoculación/actividad durante los 5-7 días previos). **C)** Actogramas representativos de la respuesta de fase a la administración de LPS o vehículo a CT15 en animales TNFR1 WT o KO. La flecha negra indica el día de inoculación. A) ANOVA de dos vías, factor cepa  $p=0.0073$ . Test Bonferroni:  $**p<0.05$  WT LPS vs el resto de los grupos. B) ANOVA de dos vías, factor tratamiento  $p=0.01$ , Test Bonferroni:  $*p<0.05$  KO LPS vs KO VEH. C57-BL/6j WT LPS/VEH:  $n=11$ , TNFR1 KO: LPS:  $n=7$ , VEH:  $n=15$ .

### **I.3.3.3 Activación de los NSQ y los NPV en respuesta al LPS**

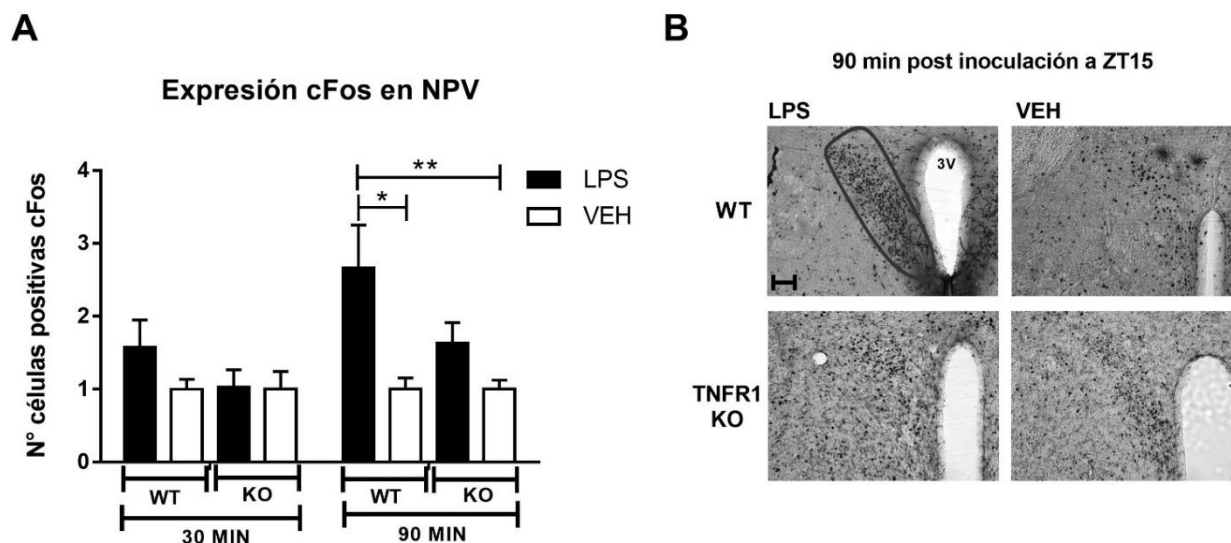
A partir de los resultados obtenidos, se decidió continuar con el análisis de la expresión de cFos en los NSQ y NPV en respuesta al LPS a ZT15 en ratones TNFR1 KO. Para ello se administró una dosis de 100  $\mu$ g/kg de LPS o vehículo a animales TNFR1 KO y WT a ZT15 y se tomaron las muestras 30 y 90 minutos después de la inoculación dado que son los tiempos en los cuales se observaron diferencias en los animales WT (sección I.3.1.2). Como se observa en la Figura I.3.8 A, en los animales TNFR1 KO, no se observa activación de la región del *Core* ni del *Shell* de los NSQ, en ninguno de los dos tiempos, En las partes C y D de la Figura I.3.8, se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica de cFos a cada tiempo en ambas cepas de animales.



**Figura 1.3.8** Expresión de cFos en las zonas del *Core* y *Shell* de los NSQ medida por Inmunohistoquímica, luego de la administración de LPS (100 µg/kg) o VEH en ratones WT y TNFR1 KO a ZT15, **A)** 30 minutos y **B)** 90 minutos después de la inoculación. Imágenes representativas de la Inmunohistoquímica de las muestras tomadas a **C)** 30 minutos y **D)** 90 minutos después de la inoculación. 3V: tercer ventrículo. QO: quiasma óptico. Barra de escala=100 µm. La línea entera delimita el NSQ total, y la punteada la región del *Core*. **A-B)** Se muestra media ± EEM del número de células positivas para cFos relativizadas al promedio del VEH de cada experimento. ANOVA de 2 vías: A) Factor tratamiento p=0.0474, B) Factor tratamiento p=0.0023, Factor interacción p=0.0069; seguido por Test de Bonferroni: \*\*p=0.0014 WT LPS vs WT VEH, \*\*\*p=0.0003 WT LPS vs KO VEH, \*\*\*\*p<0.0001 WT LPS vs KO LPS. C57-BL/6j WT/ TNFR1 KO n=4 para todos los grupos de 30 min; para 90 min: WT LPS n=7, WT VEH n=5; TNFR1 KO LPS n=9, TNFR1 KO VEH n=8.

A continuación se analizó la activación de los NPV en los animales TNFR1 KO 30 y 90 minutos después del estímulo con LPS. Los resultados obtenidos se

muestran en la Figura I.3.9. Nuevamente no se observó activación de estos núcleos luego de la administración de LPS en los animales TNFR1 KO.



**Figura I.3.9 Inmunohistoquímica de cFos en NPV** de ratones WT y TNFR1 KO inoculados con LPS (100 µg/kg, ip) o VEH en el horario ZT15. **A)** Media  $\pm$  EEM del número de número de células positivas para cFos en NPV, relativizadas al promedio del VEH de cada experimento, 30 y 90 minutos después del estímulo inmune. ANOVA de dos vías: Factor tratamiento  $p=0.0023$ , seguido por test de Bonferroni:  $*p<0.05$  WT LPS vs WT VEH,  $*p<0.01$  WT LPS vs KO VEH. **B)** Imágenes representativas de la Inmunohistoquímica de las muestras tomadas 90 minutos después de la inoculación. La línea negra delimita la región tomada en cuenta como NPV. 3V: tercer ventrículo. Barra de escala=100 µm. 30 min: WT LPS  $n=10$ , WT VEH  $n=11$ , KO LPS/VEH  $n=4$ ; 90 min: WT LPS  $n=7$ , WT VEH  $n=5$ , KO LPS  $n=9$ , KO VEH  $n=8$ .

### I.3.3.4 Expresión de genes reloj en respuesta al estímulo inmune periférico

A continuación, se analizaron los niveles de los genes reloj PER1 y 2 en respuesta al LPS, ya que, como se explicó en la sección 1.3.3 de la Introducción general, controlan las salidas del reloj central. Por otra parte, los pulsos de luz administrados durante la noche también inducen la expresión de los genes reloj Per1 y 2 en los NSQ, relacionándose generalmente la inducción de Per1 con los avances de la fase, y la de Per2 con los retrasos (Yan & Okamura 2002; Mateju 2009). Entonces se inoculó ratones WT y TNFR1 KO con una dosis de 100 µg/kg de LPS o con vehículo a ZT15, y 90 minutos después se tomaron las muestras

con las cuales se realizó una inmunohistoquímica contra la proteína reloj PER1, para la posterior cuantificación de su expresión en NSQ y NPV.

La administración de LPS produjo un aumento significativo de la expresión de PER1 en los NPV de los ratones WT con respecto a los ratones KO inoculados con LPS, y WT inoculados con vehículo ( $p=0.0121$ ), como se muestra en la Figura I.3.10. Esta activación no fue observada en ninguna de las zonas de los NSQ de ninguno de los grupos de ratones en el horario estudiado.

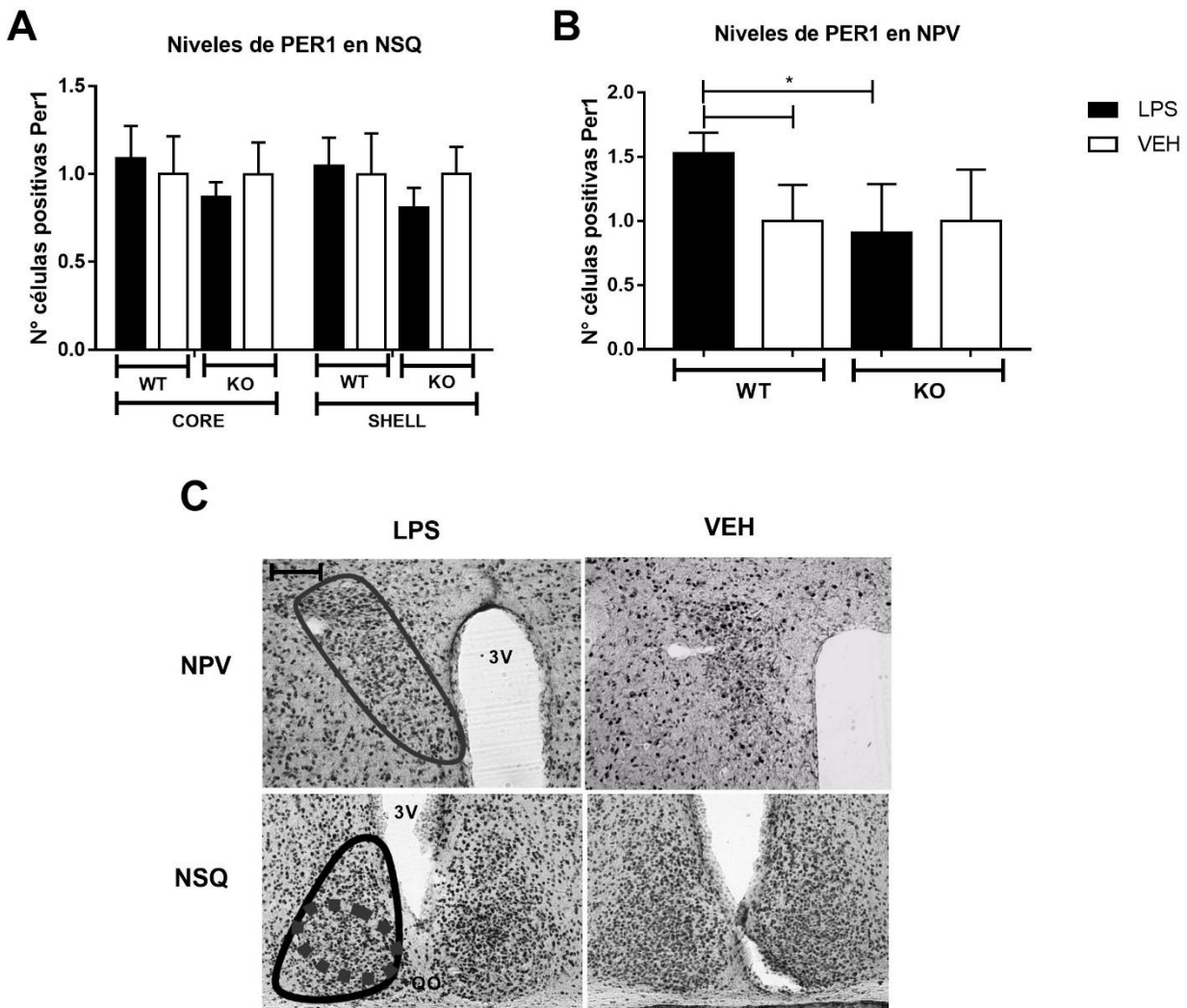
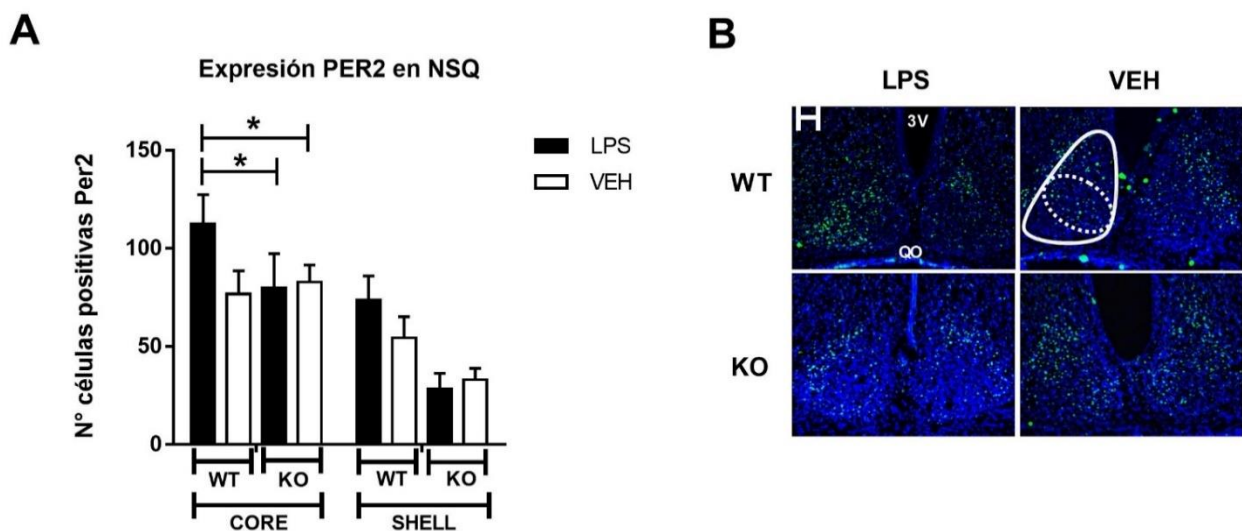


Figura I.3.10 Ver leyenda en la próxima página.



**Figura I.3.10** Expresión de PER1 en NSQ (A) y NPV (B) medida por Inmunohistoquímica, luego de la administración de LPS (100 µg/kg) o VEH en ratones WT y TNFR1 KO en el horario ZT15. Media ± EEM del número de células positivas para PER1 en NSQ y NPV, relativizadas al promedio del VEH de cada experimento. C) Imágenes representativas de la Inmunohistoquímica en NPV y NSQ de animales WT, 90 minutos después de la inoculación de LPS. Se delimita la región tenida en cuenta como NPV. Para NSQ, a línea entera delimita el NSQ total, y la punteada la región del Core. 3V: tercer ventrículo. QO: quiasma óptico. Barra de escala=100 µm. WT: LPS n=6 en NSQ y n=5 en NPV; VEH n=3 en NSQ y n=4 en NPV; TNFR1 KO: LPS n=6, VEH n=5. B) Test Kruskal Wallis p=0.0121, seguido por test de Dunn's \* p<0.05 WT LPS vs WT VEH y KO LPS.

Por último, se analizó la expresión de PER2, por lo que se administró nuevamente LPS o vehículo tanto a ratones WT como a TNFR1 KO, y se tomaron las muestras 2 horas y media (150 minutos) después de la inoculación, a partir de las cuales se realizó una inmunofluorescencia de la proteína reloj en NSQ. Los resultados obtenidos se pueden ver en la Figura I.3.11 A. En la región del core, la administración de LPS incrementó la expresión de PER2 en los NSQ de los animales WT pero no en animales TNFR1 KO (p<0.05). La zona de los NPV no mostró inmunoreactividad para PER2 en ninguno de los casos estudiados. En la parte B de la Figura I.3.11 se observan imágenes representativas de la inmunofluorescencia para PER2.



**Figura I.3.11** Ver leyenda en la próxima página.

**Figura I.3.11 Inmunofluorescencia de PER2 en los NSQ** (región del *Core* y *Shell*) de ratones WT o TNFR1 KO inoculados con LPS (100 mg/kg, ip) o VEH en el horario ZT15. Las muestras se tomaron 2 horas y 30 minutos después de la inoculación. Media  $\pm$  EEM del número de células positivas para PER2 relativizadas al promedio de los vehículos de cada zona (**A**) e imágenes representativas (**B**). La línea blanca continua delimita NSQ total, mientras que la punteada la región del *Core*. 3V: tercer ventrículo. QO: quiasma óptico. Barra de escala=100  $\mu$ m. A) Test de Kruskal Wallis: *Core*  $p < 0.05$ , seguido por test de Dunn's: \*  $p < 0.05$  core WT LPS vs KO VEH, WT LPS vs KO LPS. C57BL6/J WT LPS: n=7, VEH n=6; KO LPS/VEH: n=4.

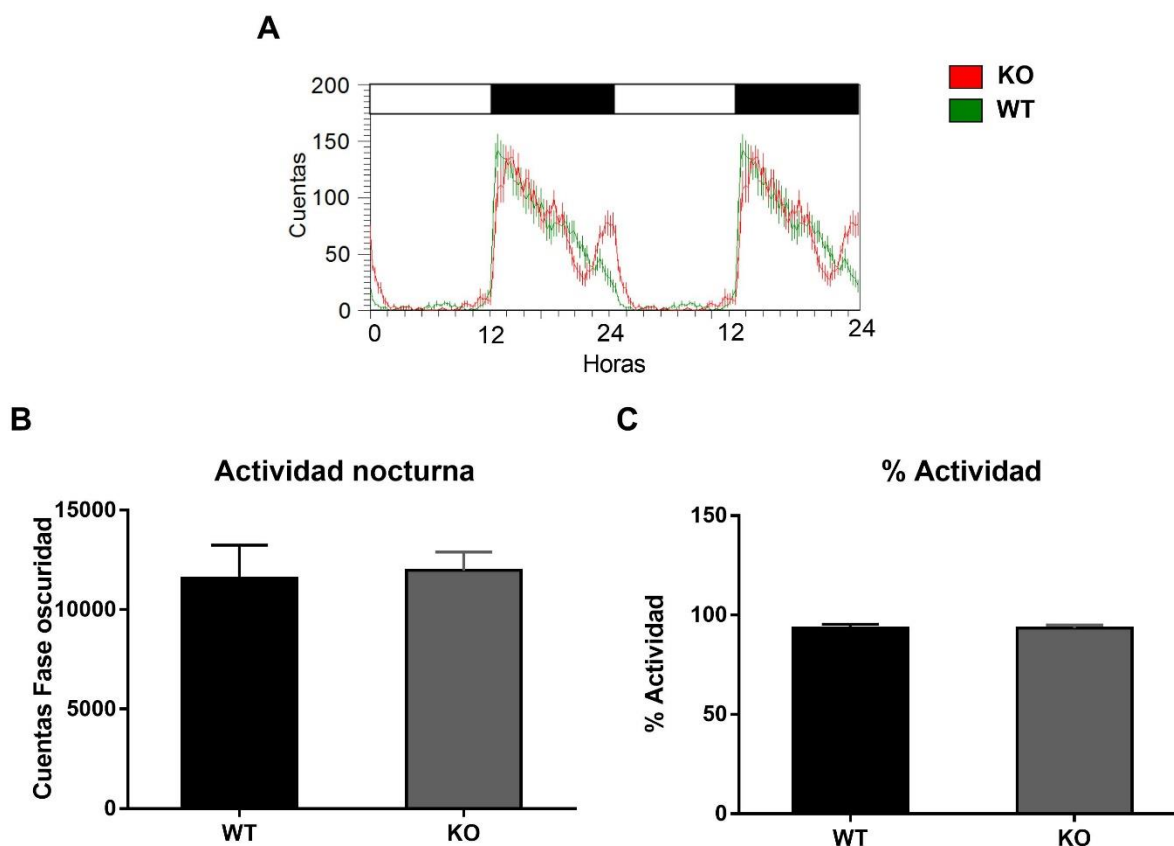
### **I.3.4 Caracterización circadiana de los animales TNFR1 KO**

Partiendo de la hipótesis de que TNF- $\alpha$  funciona como sincronizador de los NSQ, además de estudiar la respuesta circadiana al LPS en los animales TNFR1 KO, se decidió caracterizar el sistema circadiano de estos animales, ya que hasta el momento no se tenía ningún tipo de información al respecto. Para ello se registró la actividad locomotora en rueda de estos animales a partir de la cual se evaluó al sistema circadiano utilizando diferentes estrategias cronobiológicas.

#### **I.3.4.1 Patrón de actividad en condiciones de LO**

En primer lugar se registró la actividad locomotora en rueda en animales mantenidos en un ciclo de LO 12:12, y se analizó el patrón de actividad. En la Figura I.3.12 A se puede observar una *waveform* promedio realizada a partir de las *waveforms* individuales (ver sección 1.4.2 de la Introducción general) de los animales WT y los TNFR1 KO. Como muestra la Figura I.3.12 B y C, los ratones TNFR1 KO presentaron similar cantidad de actividad durante la noche a los ratones WT, representando esto un porcentaje similar de la actividad total.

Asimismo, se observó que fueron capaces de sincronizarse normalmente al ciclo LO de 24hs, exhibiendo la misma fase que los ratones WT.



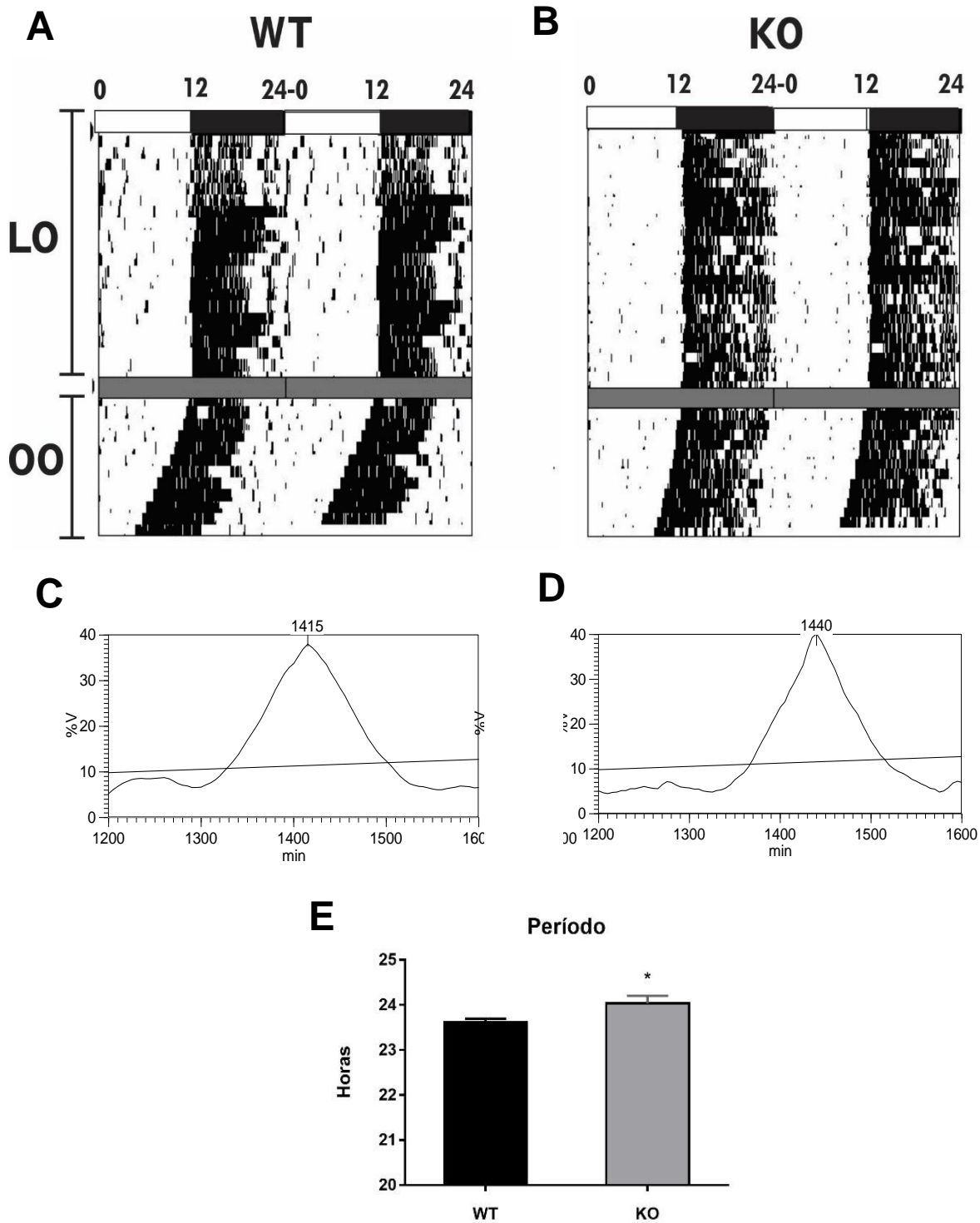
**Figura I.3.12. Caracterización circadiana del patrón de actividad locomotora de los ratones TNFR1 KO en condiciones de LO.** C) *Waveform* promedio de los animales WT (verde) y KO (rojo) en LO. La *waveform* muestra la distribución de la actividad a lo largo del tiempo. Se graficó un día por duplicado. Media  $\pm$  EEM de B) actividad total en rueda durante la noche y, C) porcentaje de actividad en rueda durante la noche. C57-BL/6j WT: n=10, TNFR1 KO: n=11.

#### I.3.4.2 Período endógeno de actividad locomotora de los ratones TNFR1 KO

Una vez que confirmamos que los ratones TNFR1 KO no presentaban diferencias en la sincronización al ciclo LO con respecto a los WT, se los pasó a un ciclo OO, para estudiar el período endógeno y patrón de actividad en condiciones constantes. En la Figura I.3.13, se muestran actogramas representativos de un animal WT y otro TNFR1 KO. La parte superior del actograma corresponde a los días en los que el animal se mantuvo en

condiciones de LO. Como se describió en la sección anterior, en estas condiciones los animales TNFR1 KO presentan actividad nocturna, sincronizada con el ciclo de LO, al igual que los WT.

La parte inferior del actograma muestra el patrón de actividad en condiciones de oscuridad constante. Como se observa en la figura, el inicio de actividad en OO es cada día unos minutos antes, lo que indica que ambas cepas tienen un período endógeno inferior a 24 horas. La Figura I.3.13 C y D, muestra los periodogramas (explicados en la sección 1.4.2 de la Introducción general) correspondientes a los días en condiciones de OO de los actogramas representativos que se muestran en A y B. Como se observa en la Figura I.3.13 E, el período endógeno ( $\tau$ ) correspondiente a los animales TNFR1 KO es significativamente mayor que el observado en los WT (KO:  $24,03 \pm 0,17$  horas /  $1442,25 \pm 9,94$  min; WT:  $23,62 \pm 4,91$  horas /  $1418,13 \pm 0,07$  min;  $p=0.030$ ).

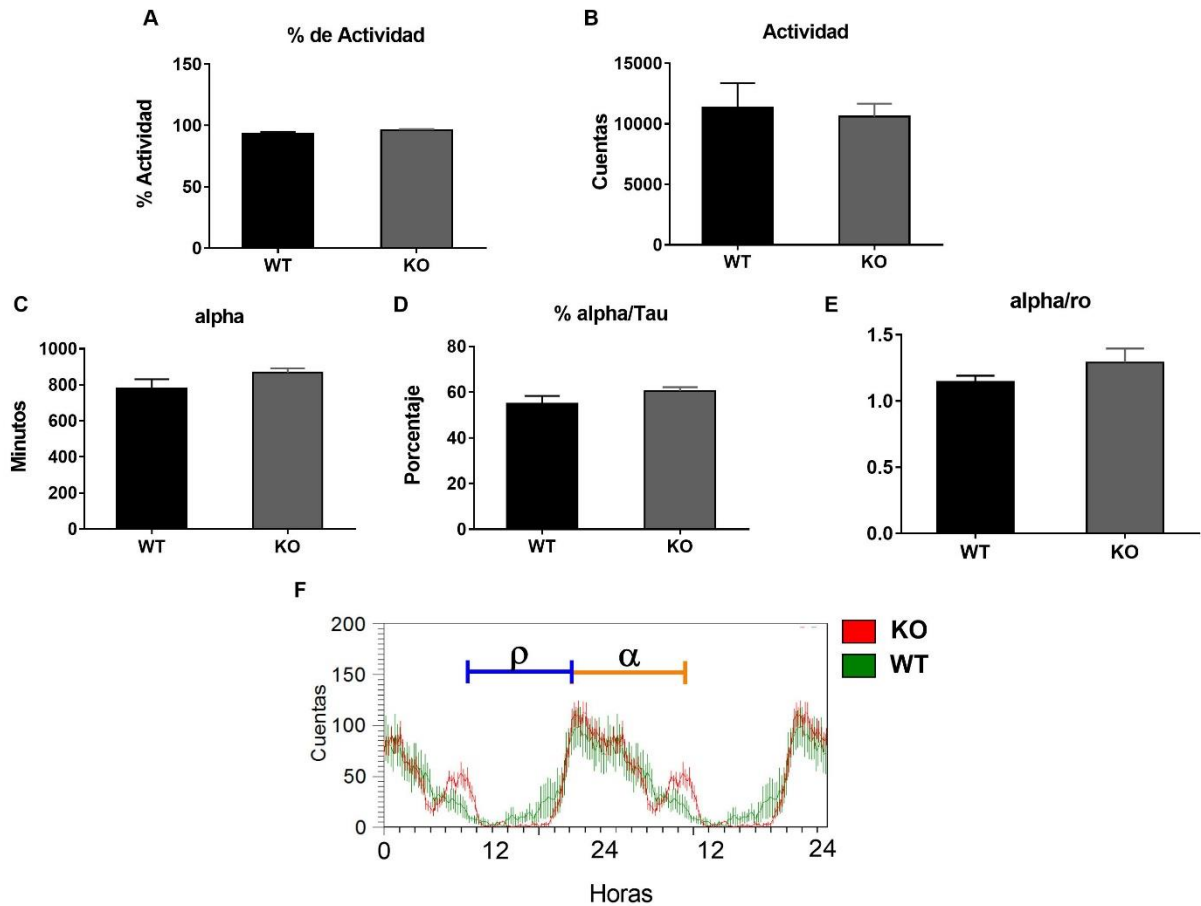


**Figura I.3.13 Actograma de actividad locomotora en LO y OO de:** A) a un animal WT y B) un animal TNFR1 KO, con sus correspondientes periodogramas: C) animal WT y D) animal TNFR1 KO. El periodograma muestra el período significativo utilizando como serie temporal los días que el animal se encontró en condiciones de OO. E) Media  $\pm$  EEM del período de libre curso (en horas) de los animales WT y KO. Test de Mann Whitney: \* $p=0,03$ .

### I.3.4.3 Patrón de actividad en condiciones de OO

A continuación se analizaron los parámetros que permiten conocer cómo se estructura el patrón de actividad en condiciones de libre curso. Para ello se estudió la distribución de la actividad entre la noche y el día subjetivos, y la duración de los mismos. Los datos que se muestran a continuación se tomaron de las *waveform* individuales como se explica en la sección I.2.2.1. Se evaluó la cantidad de actividad durante la noche subjetiva y el porcentaje que esta representa de la actividad total de cada animal. Adicionalmente, se evaluaron los parámetros de distribución relativa de las fases de actividad (noche subjetiva) y reposo (día subjetivo) utilizando los parámetros,  $\alpha$  y  $\rho$ , los cuales representan la duración de la fase de actividad y reposo, respectivamente. A partir de estos parámetros se realizaron los cocientes  $\alpha/\tau$  y  $\alpha/\rho$ , ambos indicadores de la relación entre la duración de cada una de las fases (donde  $\tau=\alpha+\rho$ ).

El porcentaje de actividad y las cuentas de actividad en rueda durante la noche subjetiva en los animales TNFR1 KO fue similar a la observada en los animales WT (Figura I.3.14 A y B), al igual que la duración de la noche subjetiva ( $\alpha$ , alpha; Figura I.3.14 C), el cociente entre  $\alpha$  y el período (Figura I.3.14 D) y el cociente entre  $\alpha$  y  $\rho$  (Figura I.3.14 E). Además, como se muestra en la *waveform* de la Figura I.3.14 F, la distribución de la actividad en condiciones constantes es muy similar en los ratones TNFR1 KO comparados a los WT.

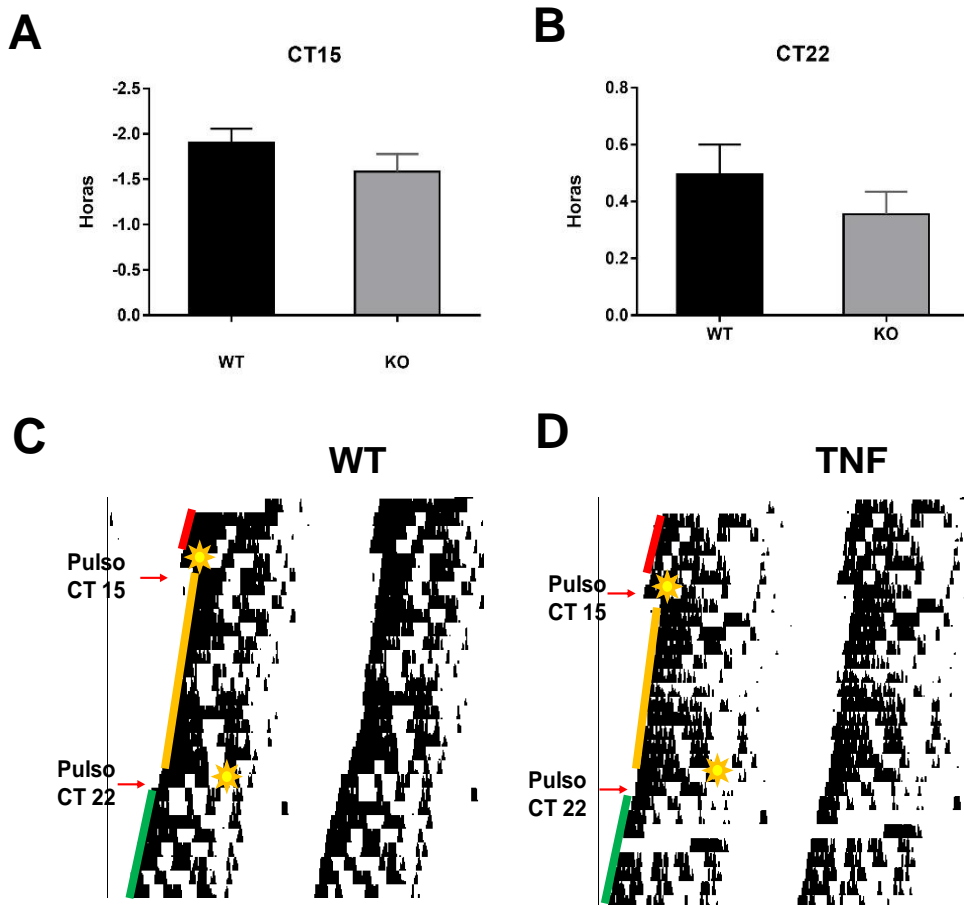


**Figura I.3.14. Caracterización circadiana del patrón de actividad locomotora de los ratones TNFR1 KO en condiciones constantes.** Media  $\pm$  EEM de A) Porcentaje de actividad en rueda durante la noche subjetiva (alpha,  $\alpha$ ). B) Cuentas de actividad total en rueda durante la noche. C) Duración del  $\alpha$  en minutos. D) Cociente entre  $\alpha$  y el período ( $\tau$ ,  $\tau$ ). E) Cociente entre  $\alpha$  y  $\rho$ . F) *Waveform* promedio de los animales WT (verde) y KO (rojo) en OO. La barra azul muestra el período considerado como  $\rho$ , y la naranja el  $\alpha$ . C57-BL/6j WT: n=10, TNFR1 KO: n=11.

#### I.3.4.4 Respuesta a los pulsos de luz

Como se explicó anteriormente (sección 1.2.3 de la Introducción general), la CRF (curva de respuesta de fase) a la luz es una característica intrínseca del sistema circadiano de cada especie animal. En ratones, los pulsos de luz administrados durante la noche subjetiva producen cambios en la fase del ritmo de actividad locomotora. Cuando estos se administran al principio de la noche subjetiva, provocan retrasos de fase; mientras que al ser administrados al final

de la noche subjetiva provocan adelantos de fase. En la Figura I.3.15 A y B se muestra la caracterización de la respuesta a pulsos de 100 lux con una duración de 10 minutos, en condiciones de OO. Se puede observar que los animales TNFR1 KO mostraron cambios de fase similares a los WT en respuesta a los pulsos de luz a CT15 y a CT22 (Pulso a CT15, WT:  $-1.9 \pm 0.1533h$ , KO:  $-1.584 \pm 0.1941h$ ; Pulso a CT22, WT:  $0.4950 \pm 0.1055h$ , KO:  $0.3560 \pm 0.0785h$ ). En la Figura I.3.15 C y D, se muestran los actogramas de actividad locomotora representativos.



**Figura I.3.15. Respuesta a pulsos de luz en animales TNFR1 KO en condiciones de OO.** Media  $\pm$  EEM del cambio de fase generado por un pulso de luz (100 lux por 10 min) administrado a A) CT15, o B) a CT22. C-D) Actogramas representativos de los cambios en actividad locomotora en respuesta a los pulsos de luz a ambos horarios en animales TNFR1 WT y KO. Las flechas rojas indican el día y el sol amarillo el momento en el que se administró el pulso de luz. Las líneas rojas señalan el *onset* de actividad antes del pulso a CT15, las amarillas después del pulso a CT15 y previo al pulso a CT22, y las verdes después del pulso a CT22. (A) WT: n= 10, TNFR1 KO: n= 11 (B) WT: n= 10, TNFR KO: n=10.



### I.3.4.5 Resincronización a un nuevo ciclo de LO

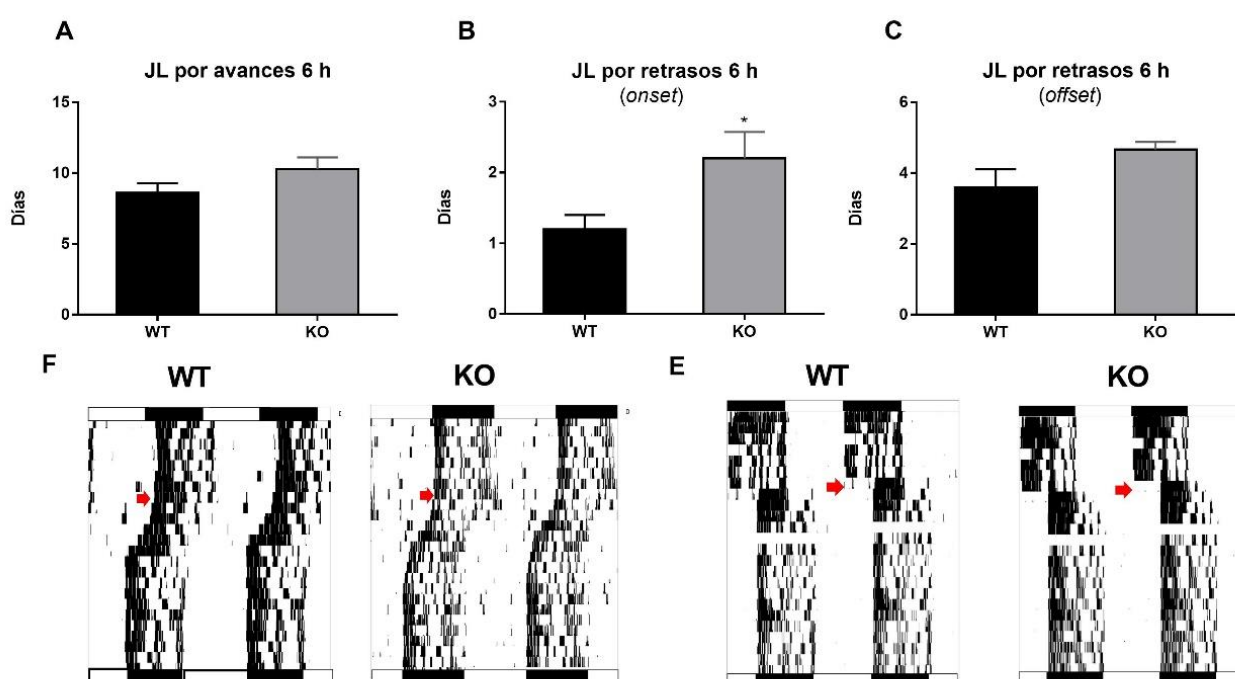
Adicionalmente, se estudió la actividad locomotora de estos animales bajo un protocolo de desincronización forzada (*jet lag* experimental) aguda, con el objetivo de conocer el tiempo (en días) que tardan en resincronizarse al nuevo ciclo de LO. Para ello se los expuso a cambios en la fase del ciclo de LO12:12, consistentes a un avance o retraso de 6 horas del horario de encendido y apagado de las luces. Como se observa en la Figura I.3.16 A, los animales TNFR1 KO no mostraron diferencias con respecto a los WT, en el tiempo de resincronización al *jet lag* por avance de fase (WT:  $8.6 \pm 0.6864$  días, KO:  $10.27 \pm 0.8322$  días).

En el caso del *jet-lag* por retraso de fase los días de resincronización se calcularon teniendo en cuenta la resincronización del *onset* o inicio de la actividad (Figura I.3.16 B) y, del *offset* o final de la actividad (Figura I.3.16 C). En el caso del *onset* se tuvo en cuenta que coincidiera con el momento de apagado de las luces, mientras que en el caso del *offset*, se registró el momento a partir del cual el mismo se volvía estable (dado que en general este momento es anterior al encendido de las luces). Esto se realizó debido a que la luz puede producir un enmascaramiento del ritmo de actividad locomotora muy marcado en este tipo de manipulaciones, y de esta forma puede parecer que el animal ya se resincronizó al nuevo ciclo de LO y en realidad solo comenzó a tener actividad debido al apagado de la luz. Esta diferencia al calcular los días de resincronización no fue observada en el caso de los adelantos de fase.

El tiempo de resincronización de los animales TNFR1 KO al *jet lag* por retraso de fase, fue significativamente mayor que el de los animales WT, al calcularlo teniendo en cuenta la resincronización del *onset* (WT:  $1.2 \pm 0.2$  días,

KO:  $2.2 \pm 0.3742$  días;  $p=0,0462$ ). En cambio, cuando se calculó teniendo en cuenta la resincronización del *offset* no se observaron diferencias.

Como se esperaba ambas cepas se resincronizaron más rápidamente al *jet lag* por retraso de fase, que por adelantos (Reddy 2002). En la Figura I.3.16 E-F, se muestran actogramas representativos de este protocolo, en los cuales se puede observar como el animal se resincroniza al nuevo ciclo de LO luego del cambio de fase (flecha roja).



**Figura I.3.16 Resincronización de los ratones TNFR1 KO a protocolos de *jet-lag* (JL) agudo.** Media  $\pm$  EEM del tiempo de resincronización (días) luego del protocolo de *jet lag* A) por adelanto de 6 horas en la fase del ciclo de LO, B) por retraso de 6 horas en la fase tomando como referencia la resincronización del *onset*, o C) tomando como referencia la resincronización del *offset*. B) Test de Student:  $p=0,0462$ . F-E) Actogramas representativos de los cambios en actividad locomotora en respuesta a los adelantos o retrasos de 6 horas en la fase del ciclo de LO, en animales TNFR1 WT y KO. Las flechas rojas indican los días en los que se realizó el cambio de fase. C57.BL/6j (A) WT:  $n= 10$ , TNFR1 KO:  $n= 11$  (B) WT:  $n= 5$ , TNFR1 KO:  $n= 6$ .

## **I.4 RESUMEN DE**

## **RESULTADOS**



- La estimulación ip con LPS a ZT15 induce la expresión de cFos en los NSQ, 30 y 90 minutos después de la inoculación y los NPV a los 90 minutos y 4 horas (Sección I.3.1.2).
- Se observó un aumento de TNF- $\alpha$ , IL-6 y CCL2 en NSQ y NPV luego de la inoculación de LPS a ZT15 y ZT3 (Sección I.3.2.1).
- La expresión de TNFR1 posee un ritmo diario, con valores más altos durante la noche, específicamente a ZT15 (Sección I.3.2.2).
- El LPS administrado a ZT15 induce un aumento de los niveles de PER2 en NSQ y de PER1 en NPV (Sección I.3.3.4).
- En animales TNFR1 KO, la inoculación de LPS en la noche temprana no induce las modificaciones circadianas observadas en los animales WT, ni a nivel comportamental (cambio de fase) ni molecular (inducción de cFos, PER1 y PER2 en NSQ y/o NPV; Secciones I.3.3.2, I.3.3.3 y I.3.3.4).
- Los animales TNFR1 KO poseen un período endógeno de actividad locomotora mayor al de los WT. (Sección I.3.4.1), mostraron un tiempo de resincronización al JL por retraso de fase mayor a los controles (calculando los días a partir de la resincronización del *onset*. Sección I.3.4.5).



## **I.5 DISCUSIÓN**





En este primer capítulo se intentó profundizar los conocimientos existentes sobre la interacción entre el sistema inmune y el circadiano, teniendo como hipótesis que la citoquina TNF- $\alpha$  actúa como mensajero de esta comunicación. Por esta razón, el objetivo principal fue evaluar la participación de esta citoquina pro-inflamatoria y su receptor en dicha interacción.

Para realizar esto se utilizó un modelo murino de inflamación aguda leve, inducida por la administración de dosis bajas de LPS. De esta forma se induce la expresión en cerebro y tejidos periféricos de citoquinas pro-inflamatorias, entre ellas, TNF- $\alpha$ . Estas dosis bajas de LPS son capaces de inducir cambios en la fase del ritmo de actividad locomotora al administrarse a CT15, pero no en otros momentos del ciclo circadiano. Por lo tanto, se decidió utilizar este modelo para estudiar en mayor profundidad los efectos de la citoquina TNF- $\alpha$  sobre el sistema circadiano, los cuales desencadenan ésta respuesta al LPS. Para llevar a cabo esta caracterización también se utilizó como herramienta ratones deficientes del receptor tipo 1 para esta citoquina.

### **I.5.1 Respuesta circadiana al LPS**

Experimentos previos de nuestro laboratorio demostraron que la administración de LPS produce un retraso de fase del ritmo de actividad comportamental durante la noche temprana, mostrando un comportamiento similar al inducido por los pulsos de luz (Marpegan 2005; Paladino 2010). Los cambios de fase del ritmo de actividad locomotora reflejan cambios en variables de salida controladas por el reloj circadiano, y son necesarios para una correcta sincronización con el ambiente. Debido a esto se hipotetizó que el LPS estaría

induciendo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, que activarían mecanismos de señalización hacia el SNC para ajustar la actividad del reloj y por lo tanto variables de salida como la actividad locomotora. De este modo, el LPS (o las moléculas inducidas por esta endotoxina) estaría actuando como un *zeitgeber*.

Efectivamente, y como ha sido reportado en muchos trabajos (Turrin 2001; Schneiders 2015), observamos que estas dosis de LPS producen un aumento en los niveles circulantes de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (Leone 2012).

Posteriormente se observó que la administración icv de las citoquinas IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  a CT15 induce el mismo retraso de fase que el LPS y, a su vez, la administración icv del receptor soluble de TNF- $\alpha$  (el cual bloquea la acción de la citoquina), inhibe el efecto circadiano de la inoculación periférica del LPS (Leone 2012). De esta forma se demostró que la citoquina TNF- $\alpha$  posee un papel muy importante en la comunicación inmune-circadiana en este modelo actuando directamente a nivel hipotalámico.

En este trabajo hemos demostrado que el LPS induce niveles similares de TNF- $\alpha$  (junto con otras citoquinas) en NSQ cuando es administrado durante el día (ZT3) y durante la noche (ZT15), pero que la expresión de TNFR1 muestra diferencias diarias con niveles mayores durante la noche. Estos datos sugieren un rol fundamental de este par ligando-receptor en este sistema, dado que la restricción horaria de este receptor podría ser la clave de que la respuesta circadiana al LPS se dé únicamente al comienzo de la noche subjetiva.

Otro resultado importante que surge de esta tesis es que la respuesta circadiana al LPS depende de la interacción entre TNF- $\alpha$  y TNFR1, dado que animales deficientes de este receptor no presentaron respuesta circadiana al LPS,

a nivel molecular (inducción de cFos, PER1 y PER2 en NSQ y/o NPV) ni comportamental (cambio de fase del ritmos de actividad), confirmando la relevancia de estas moléculas en dicha respuesta. Sin embargo, sí se produjo una inhibición de la actividad locomotora luego de la inoculación de LPS de los animales TNFR1 KO, indicando que esta variable se inhibe por una vía independiente de TNF- $\alpha$ .

Resultados más recientes de nuestro grupo de trabajo, demostraron que la quemoquina CCL2 también es capaz de inducir cambios en la fase del ritmo de actividad locomotora al ser administrada por vía icv a CT15; y que el efecto circadiano del LPS es bloqueado si previamente se inocula por dicha vía un inhibidor de la síntesis de esa molécula. Adicionalmente se demostró que los niveles de esta quemoquina se incrementan en NSQ, luego del estímulo periférico con LPS (al igual que vemos en este trabajo) (Duhart 2016). Diversos estudios han demostrado que las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son capaces de incrementar la expresión de CCL2 en distintos tipos celulares, incluyendo astrocitos (Ho 2008; Thompson & Van Eldik 2009; Weber 2010). Por lo tanto, se podría hipotetizar que CCL2 actúa río abajo de la señalización por TNF $\alpha$ , es decir, es consecuencia de la respuesta desencadenada por esta citoquina. Sin embargo, en este trabajo hemos observado que esta molécula se induce en los NSQ independientemente del horario de administración del LPS. Por lo tanto, esta quemoquina parecería ser necesaria, pero no suficiente para que se produzca el cambio de fase en el ritmo de actividad locomotora en respuesta al LPS.

Adicionalmente, como se explica en la Introducción general (Sección 3.2.2) existe evidencia de que el factor de transcripción NF-kB (involucrado en la

respuesta inflamatoria) se expresa en NSQ y participa de la respuesta en los cambios de fase inducidos por pulsos de luz o por la administración de LPS (Marpegan 2004; Marpegan 2005). Estudios más recientes demostraron que la administración periférica de LPS incrementa la expresión de las subunidades que componen a este factor de transcripción en NSQ (O'Keeffe 2017). Como ya lo mencionamos, las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  activan NF-kB, el cual induce la expresión de las citoquinas IL-6 y CCL2 (Harada 2011; Kroon 2013; Poon 2013). Resultados *in vitro* previos de nuestro laboratorio muestran que los astrocitos presentes en los NSQ activan las funciones de NF-kB en respuesta a señales inmunes; en particular, son capaces de secretar IL-6, TNF- $\alpha$  y CCL2 luego del estímulo con TNF- $\alpha$  (Leone 2006; Duhart 2013). Estos resultados sugieren que las células gliales pueden representar una interfase entre el sistema inmune y el circadiano.

### **I.5.2 Expresión de TNF- $\alpha$ y su receptor, TNFR1, en los NSQ y NPV**

Diferentes trabajos demostraron la expresión de citoquinas y sus receptores, en diferentes regiones del cerebro de roedores, como el hipotálamo y la corteza cerebral, junto con variaciones en su expresión a lo largo del día (Utsuyama & Hirokawa 2002; Cearley 2003; Hight 2010). En particular, en cuanto a TNF- $\alpha$  se ha observado una variación diaria de sus niveles de ARN, siendo mayores al principio del día en hipotálamo, hipocampo y corteza cerebral, en condiciones fisiológicas (Floyd & Krueger 1997; Krueger 2008). También se observó que la administración de LPS induce la expresión de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en corteza, hipocampo e hipotálamo (Del Rey 2000; Turrin 2001).

Al igual que en este trabajo, Kakizaki y colaboradores, han encontrado un incremento en los niveles de estas citoquinas en NPV en respuesta al LPS (Kakizaki 1999). Las responsables de la secreción de estas citoquinas en el SNC serían las células de la glía y algunos tipos neuronales (Ransohoff & Engelhardt 2012). En línea con los datos mencionados, en este trabajo se demostró la inducción de TNF- $\alpha$ , IL-6 y CCL2 en los NSQ y NPV luego de la administración de dosis bajas de LPS por vía ip.

Como se mencionó varias veces a lo largo de este capítulo, la inyección central de citoquinas produce alteraciones en el SNC. Esto es una evidencia de que existen receptores para estas moléculas en el SNC. Se ha demostrado la expresión de IL-1 $\beta$  y su receptor IL-1R1 en los NSQ y NPV de ratón, con un incremento de IL-1R hacia el final de la noche (Beynon & Coogan 2010). Por otra parte, estudios recientes de este laboratorio demostraron variaciones diarias en la expresión de CCL2 y su receptor CCR2 en los NSQ de ratón, con un incremento de los niveles durante la noche (Duhart 2016). En cuanto a la señalización por TNF- $\alpha$ , se observó que los receptores TNFR1 y TNFR2 se expresan en diversas regiones cerebrales y en respuesta a estímulos inflamatorios (Botchkina 1997; Sadki 2007; Camara 2015). Pero hasta el momento no existía información precisa acerca de la existencia de ritmos diarios en la expresión de TNFR1 en los NSQ. En este trabajo se demostró que la expresión de TNFR1 aumenta durante la noche, más específicamente a ZT15 en NSQ.

En resumen, los resultados hasta aquí mencionados sumados a los datos bibliográficos sugieren que las señales inmunes producidas en periferia pueden estimular los NSQ independientemente de la hora del día; y que la expresión

circadiana del receptor TNFR1 en NSQ podría ser la responsable de la dependencia horaria de la respuesta circadiana observada. Luego de que TNF- $\alpha$  interactúa con su receptor TNFR1 en los NSQ (probablemente en astrocitos) activaría una cascada de señalización, en la que participaría NF $\kappa$ B, que induce la expresión de otras moléculas inmunes, como CCL2, la cual también sería necesaria para modificar las salidas del reloj.

### **I.5.3 Activación de los NSQ en respuesta al LPS**

Como ya se explicó, en los NSQ reside el reloj central responsable de las oscilaciones circadianas. Estos núcleos se dividen en dos zonas: el *Core*, el cual recibe principalmente las señales fóticas desde la retina, y *Shell*, que es modulada por proyecciones neuronales provenientes del *Core* y de otras regiones cerebrales (Yan 2007). Las células de los NSQ al activarse por la llegada de un estímulo fótico, expresan el gen inmediatamente temprano cFos (Beaule & Amir 1999).

Estudios previos de nuestro laboratorio observaron la activación de los NSQ 90 minutos después de la administración de LPS a CT15, con una distribución mayormente dorsal (hacia la región del Shell; (Marpegan 2005). Por estas razones se decidió hacer una cinética de activación de los NSQ luego del estímulo inmune a ZT15. Los resultados obtenidos muestran que la endotoxina activa la región del *Core* de los NSQ 30 minutos después de la inoculación; mientras que a los 90 minutos vuelve a activarse el *Core* pero también se activa la región *Shell*. Adicionalmente, no se observó activación de los NSQ al administrar la endotoxina a ZT3, lo que indica que esta respuesta depende del

horario de estimulación. Ya ha sido reportado que la administración icv de TNF- $\alpha$  junto con IFN- $\gamma$  estimula la expresión de cFos en NSQ y NPV, con una mayor activación de los NSQ durante la noche temprana (Sadki 2007).

En relación a los NPV, como ya se mencionó, son una de las principales vías de salida de los NSQ y regulan, entre otras variables, al sistema inmune (Kalsbeek 2006; Belevych 2010). Por lo tanto, es posible hipotetizar que los NSQ, en respuesta al estímulo inmune, envíen señales a los NPV, los cuales podrían modular al sistema inmune. La activación de los NPV luego de la estimulación periférica con LPS ha sido reportada previamente (Bienkowski & Rinaman 2008; Singru 2008). En este trabajo se observó un aumento significativo en la expresión de cFos, a los 90 minutos y 4 horas después de la administración de LPS a ZT15. Como se explicó en la sección 3.1.2, los NPV forman parte del eje HPA y son los responsables de liberar CRH, una de las hormonas inductoras de la secreción de glucocorticoides (Hueston & Deak 2014; Herman & Tasker 2016). Kalsbeek y colaboradores, observaron que la administración de dosis bajas de LPS por vía intravenosa en ratas, induce un incremento en los niveles de corticosterona circulante, el cual es mayor cuando el LPS es administrado durante el día. Esto indicaría que existe una respuesta diferencial del HPA de acuerdo al horario del estímulo inmune. Asimismo, también observaron que la lesión de los NSQ produce un aumento en la secreción de corticosterona en respuesta al LPS (Kalsbeek 2006). Estos datos proveen evidencias de que el LPS es capaz de modular circadianamente las respuestas neuroendócrinas, como la liberación de glucocorticoides. Esto podría darse a través de la activación de los NSQ, que luego señalarían a los NPV.

#### **I.5.4 Expresión de genes reloj en respuesta al LPS**

Luego de la activación neuronal en los NSQ, que en este trabajo evaluamos a través del marcador cFos, se inducen modificaciones en la expresión de alguno/s de los genes reloj (Kornhauser 1996), los cuales son los responsables de controlar el funcionamiento del mismo y por lo tanto de sus salidas, que en este caso observamos como cambios de fase del ritmo comportamental.

Como se dijo anteriormente (sección 1.3.3 de la Introducción general), los pulsos de luz durante la noche subjetiva inducen la expresión de PER1 y PER2 en los NSQ (Yan & Okamura 2002). Además, ha sido demostrada la relación bidireccional que existe entre algunas citoquinas, como TNF- $\alpha$  e IL-6 y genes reloj, tanto en modelos animales genéticamente modificados como en cultivos celulares (Cavadini 2007; Petrzilka 2009; Narasimamurthy 2012). Por lo tanto, en este trabajo se hipotetizó que un estímulo como el LPS podría modificar la expresión de los genes reloj en NSQ, de modo que se analizó la expresión de PER1 y PER2 en NSQ y NPV.

En cuanto a PER1, su expresión no se modificó en ninguna de las regiones de los NSQ (*Core* y *Shell*) 90 minutos después de la administración de LPS. En cambio, sí se observó un aumento en su expresión en los NPV 90 minutos después del estímulo, tal como había sido reportado previamente (Marpegan 2005). En forma similar Takahashi y colaboradores, encontraron que la administración de dosis bajas de LPS a ZT22 incrementa los niveles de expresión de ARNm de *Per1* en NPV 1 hora después del estímulo, pero no en NSQ (Takahashi 2001), sugiriendo que el LPS induce la expresión de *Per1* en



PVN en diferentes horarios. Sin embargo, para descartar la inducción de *Per1* en los NSQ en respuesta al LPS sería necesario analizar otros tiempos post-inoculación. Por otra parte, la vía de activación de los NPV depende de TNF- $\alpha$  dado que dicha activación resultó abolida en los animales TNFR1 KO.

Por otro lado, la expresión de *PER2* se induce en ambas zonas de los NSQ, 2 horas y media después de la inoculación con LPS. En el estudio de Takahashi y colaboradores, se muestra que una dosis de 50  $\mu$ g/kg de LPS administrada ip en ratones a ZT22 no induce cambios en los niveles de ARNm de *Per2* en NSQ 1, 3 o 24 horas después del estímulo (Takahashi 2001); mientras que dosis más altas de esta endotoxina (1 mg/kg) administradas en ratas a ZT1 disminuyeron los niveles de ARNm de *Per2* en estos núcleos (Okada 2008). La diferencia entre estos reportes y nuestros resultados podrían deberse a la hora de inoculación, a las dosis de LPS utilizadas, o al modelo animal (en el estudio de Okada). Adicionalmente, en este trabajo no se observó ningún cambio en la expresión de *PER2* en los animales TNFR1 KO en respuesta al estímulo inmune.

Otros estudios han demostrado que TNF- $\alpha$  inhibe la expresión de *Per1* y *Per2* en cultivo de fibroblastos como así también en el hígado de ratones tratados con esta citoquina (Cavadini 2007), y que este efecto estaría mediado por p38 MAPK (Petrzilka 2009). Como se puede observar los efectos de TNF- $\alpha$  sobre los genes reloj parecen ser complejos y depender en gran parte del contexto en el que se estudia (horario y/o tejido).

En conjunto, estos resultados confirman que 1) el LPS modifica la fase del reloj a través de cambios en sus mecanismos moleculares, 2) que esto depende del horario en que se administra el estímulo y que 3) TNFR1 es necesario para

que se generen estos cambios circadianos a nivel molecular. Es posible que la modulación de la expresión de *Per2* central participe de la señalización temporal a periferia, pero es necesario un estudio más profundo del impacto periférico de esta modulación llevada a cabo por el reloj central.

### **I.5.5 Posibles vías de comunicación immune-circadianas**

Aun no se conoce la forma específica mediante la cual el estímulo inmune llega a los NSQ. Aparentemente, el LPS en la dosis utilizada (100 ug/kg) es incapaz de cruzar la BHE, pero puede unirse a receptores específicos en el endotelio vascular e inducir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Jiang 1999; Singh & Jiang 2004). Se ha demostrado que el receptor TLR4, el receptor de LPS, se expresa en varias regiones cerebrales, especialmente en células endoteliales, órganos circumventriculares y en estructuras que se encuentran cercanas a los ventrículos cerebrales, como lo es el NPV (que se activarían cuando el LPS atraviesa la BHE y logra ingresar al cerebro (Laflamme & Rivest 2001; Mallard 2012). La interacción del LPS con el TLR4 presente en las células epiteliales o en los órganos circumventriculares, podría ser una de las vías por las que se inducen las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6 y la quemoquina CCL2 en los NSQ luego de la inoculación de LPS.

Por otro lado, las citoquinas podrían entrar al cerebro a través de los órganos circumventriculares, los cuales como se explicó en la sección 3.1.2, poseen una BHE más débil debido a la presencia de endotelio fenestrado. Por ejemplo, se ha observado que las citoquinas pueden ingresar al tejido cerebral a través de una estructura denominada *organum vasculosum laminae terminalis*

(OVLТ) y de esta forma modular la respuesta febril (Romanovsky 2003). Una vez en el cerebro éstas podrían inducir la expresión de las mismas u otras citoquinas que amplifiquen la respuesta inflamatoria.

Como mencionamos previamente, una de las moléculas que encontramos que se induce en NSQ luego del estímulo inmune es la quemoquina CCL2. Existe evidencia de que esta quemoquina puede debilitar la BHE y de esta forma facilitar el ingreso de otras moléculas al cerebro (Roberts 2012; Yao & Tsirka 2014). Adicionalmente, la inducción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , en respuesta al LPS, en la corteza cerebral e hipocampo depende de la señalización mediada por esta quemoquina (Thompson & Van Eldik 2009).

Finalmente, también sería posible que el LPS o las citoquinas actúen a través de terminales nerviosas periféricas e induzcan la expresión de citoquinas en los NSQ. Se ha demostrado que las neuronas aferentes del nervio vago expresan TLR4 e IL-1R (Hosoi 2005; Pavlov & Tracey 2012), por lo que tanto el LPS o IL-1 secretada en respuesta al estímulo pueden activar dichas terminales nerviosas. Hay estudios que demuestran que la vagotomía (extracción del nervio vago) disminuye la respuesta febril y secreción de corticosterona en respuesta a la administración periférica de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Fleshner 1998); mientras que otros afirman que dicha manipulación tiene poco efecto sobre la respuesta central al LPS, sugiriendo que otras vías de señalización serían responsables de esta comunicación (Hansen 2000).

Teniendo en cuenta que en este trabajo se demostró que la proteína TNF- $\alpha$  está presente en dicho núcleo luego de la inoculación de LPS, sería válido pensar que esta citoquina llega directamente desde circulación o se expresa en los NSQ a través de alguna de las vías mencionadas previamente, y señala a

través de su receptor (el cual demostramos que se expresa en NSQ) para ajustar la fase del reloj circadiano.

### **I.5.6 Caracterización circadiana de los ratones TNFR1 KO**

La caracterización circadiana de los animales TNFR1 KO tiene 2 objetivos, en primer lugar, conocer las características circadianas del modelo que se va a utilizar para evaluar al sistema circadiano (independientemente del estímulo que se utilice). Por otro lado, a partir de la hipótesis de que TNF- $\alpha$  puede funcionar como un sincronizador de los NSQ, resulta interesante evaluar cómo funciona el sistema circadiano en condiciones fisiológicas (sin estímulo inmune) careciendo de esta vía de señalización.

En un principio, se confirmó que, en un ciclo LO12:12, estos animales poseen actividad nocturna con parámetros similares a los observados en los animales control. Por otro lado, como se explica en la Introducción general (sección 1.4.2), bajo condiciones constantes o de libre curso (OO), los ritmos circadianos toman períodos cercanos a las 24 horas. En ratones de la cepa BALB/c el período endógeno es cercano a las 23h (Shimomura 2001); mientras que en la cepa C57bl/6 y C57bl/10, se encuentra entre 23.3 y 23.9h (Schwartz & Zimmerman 1990). En este caso, el período endógeno de los animales TNFR1 KO, resultó ser de  $24,03 \pm 0,17h$ , significativamente mayor que en los animales WT, sin embargo, aunque no se observaron diferencias en los patrones de actividad.

El sistema circadiano responde a la sincronización mediada por los pulsos de luz administrados durante la noche subjetiva, con cambios en su fase. Los

ratones TNFR1 KO respondieron a los pulsos de luz administrados a CT15, retrasando su fase, mientras que al recibir el pulso durante las últimas horas de la noche subjetiva, a CT22, adelantaron su fase. Los cambios de fase inducidos por los pulsos administrados a CT15 resultaron mayores que los inducidos por los pulsos administrados a CT22, siendo los valores muy similares entre ambas cepas. Este resultado era esperable, ya que, como podría observarse en la CRF de los ratones (Figura 1.5 de la Introducción general), los pulsos de luz dan cambios de fase de mayor magnitud en la zona de retrasos (noche temprana) que en la zona de adelantos (noche tardía).

Tanto los animales KO como los WT se resincronizaron más rápido a una situación simulada de *jet-lag* por retrasos que por adelantos, lo cual se debe a la mayor sensibilidad a la luz que poseen en la zona de retrasos, como recién se explicó. Adicionalmente, en los animales KO, el tiempo de resincronización por retrasos resultó ser mayor que en los animales WT, cuando se calculó tomando en cuenta el *onset*; sin embargo, cuando se tomaron en cuenta los *offsets* esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. Esto nos lleva a pensar que esta diferencia se debe a un menor efecto de enmascaramiento en los animales TNFR1 KO y no a una menor capacidad de resincronización. En línea con este resultado, en el modelo de *jet-lag* inducido por adelanto, no hubo diferencias significativas en el tiempo de resincronización entre ambos grupos experimentales.



## **I.6 CONCLUSIONES**

Como conclusión general de este capítulo, podemos decir que **TNF- $\alpha$**  y su receptor **TNFR1** son una de las vías principales por las cuales el estímulo periférico con **LPS** puede ajustar la fase del reloj circadiano central. Luego de este cambio de fase del reloj central, también se ajustaría la fase de los relojes periféricos que son sincronizados por éste. Aún no sabemos si esto le confiere una ventaja adaptativa al organismo o es una simple consecuencia de los mecanismos que se llevan a cabo en respuesta al estímulo inmune.

A continuación, en la Figura I.6.1, se muestra un resumen de los resultados obtenidos junto a posibles vías involucradas.

Como se muestra en este esquema, la señal inmune generada por la inoculación de LPS a CT15, llegaría a los NSQ por alguna de las vías discutidas previamente en esta sección: a través del nervio vago, señalizando a través de receptores en las células endoteliales de la BHE o atravesándola (por difusión o por roturas de las uniones oclusivas causadas por las mismas moléculas inflamatorias); o señalizando a partir de los órganos circumventriculares. De esta forma se incrementan los niveles de las moléculas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-6 y CCL2 en NSQ, y en NPV (siendo sintetizadas en dichas zonas o arribando desde otras regiones cerebrales o desde la periferia). Una vez en los NSQ las citoquinas pueden actuar sobre éstos núcleos a través de sus receptores: en este trabajo se demostró por primera vez la presencia de TNFR1 en esta región hipotalámica, con sus niveles incrementados durante la noche, especialmente a ZT15 (y en otros trabajos la de IL-1R y CCR2; (Beynon & Coogan 2010; Duhart

2016). En particular, TNF- $\alpha$ , a través de TNFR1, desencadena los efectos diferenciales sobre los NSQ. Estos efectos incluyen: 1) un incremento de los niveles de cFos en la región del *Core* de los NSQ primero, y luego en el *Shell*, indicando activación de estos núcleos; 2) un aumento de los niveles del gen reloj PER2 en NSQ, lo cual podría estar directamente relacionado con el cambio de fase observado a nivel comportamental; 3) activación e inducción de PER1 en los NPV, probablemente a causa de una señal que llega desde los NSQ. Este último punto podría desencadenar una repuesta horaria diferencial de los glucocorticoides quienes señalarían hacia la periferia, ajustando los relojes del sistema inmune.

Sin embargo, en cuanto a la modulación de los NSQ sobre el sistema inmune luego del estímulo con LPS, aún nos quedan muchas preguntas abiertas. Sería interesante saber de qué forma llega la señal desde el reloj central hacia los periféricos, durante la estimulación inmune, y qué variables afecta esto.

Es importante resaltar que toda esta señalización solamente se cumple si está presente el receptor TNFR1, ya que otro hallazgo de este trabajo es que los ratones TNFR1 KO, no presentan cambio de fase del ritmo de actividad locomotora ni alteración en la expresión de genes reloj. Esto podría deberse a que, como no tienen el receptor en periferia, no se desencadena la misma respuesta inmunológica y por lo tanto no llega la misma señal a los NSQ (o ésta llega atenuada). Asimismo, también podría ser que la falta del receptor en los NSQ no permita que llegue el estímulo al reloj, y entonces estos núcleos no se activan (como lo observamos) ni se alteran los niveles del gen Per2 (como también se demostró en este trabajo), y entonces no se produce el cambio de fase. Para poder entender esto un poco mejor, sería importante, estudiar qué



sucede en periferia con estos ratones. Al comparar con los ratones WT, esto aportaría mayor información acerca de la modulación ejercida por el reloj central sobre los periféricos, luego del cambio de fase.

Por lo tanto, **a través de este trabajo aportamos nueva información acerca de cómo responde el sistema circadiano a un estímulo inmune capaz de alterar su actividad.** En el próximo capítulo nos centraremos en el estudio de la respuesta a las dosis altas de LPS, que llevan o no a la mortalidad, de acuerdo al horario en que se administran.

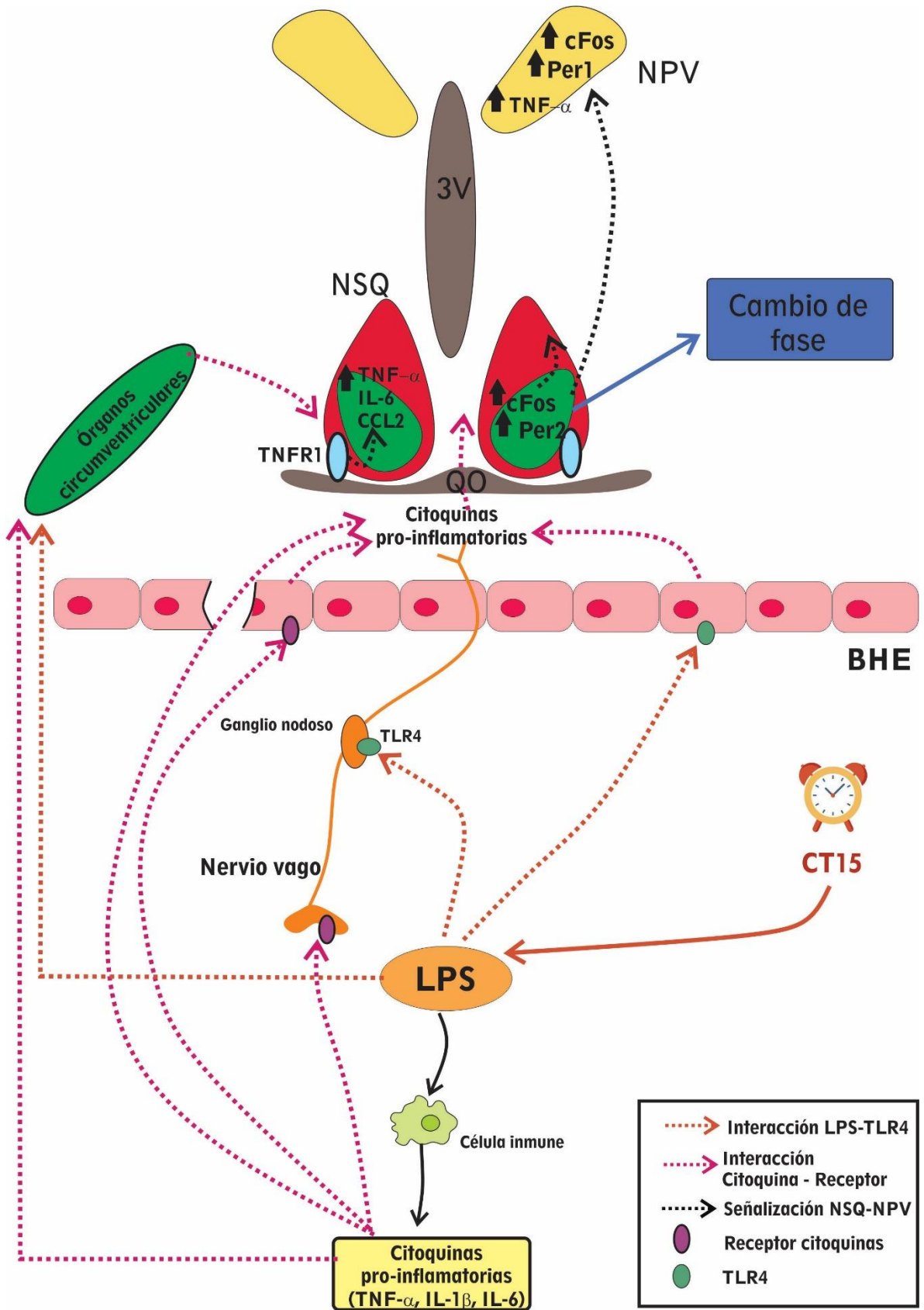


Figura I.6.1 Ver leyenda en la próxima página.

**Figura I.6.1 Resumen de los resultados obtenidos en el capítulo 1.** La administración de LPS a CT15 actúa sobre las células del sistema inmune, induciendo un aumento en los niveles circulantes de distintas citoquinas pro-inflamatorias (resultado de (Leone 2012)). Tanto el LPS como las citoquinas podrían comunicarse con los NSQ a través del nervio vago, de la BHE (a través de receptores de citoquinas o de TLR4; o atravesarla mediante su ruptura) o a través de la señalización en los órganos circumventriculares. Estas citoquinas, en particular TNF- $\alpha$ , actúan sobre los NSQ a través de sus receptores. De esta forma se induce TNF- $\alpha$ , IL-6 y CCL2 en los NSQ y los NPV, la/s cual/es señalarían a los NSQ induciendo un incremento en la activación neuronal (cFos) de la región del *Core*, que luego activa la región del *Shell*; y una inducción en la expresión de genes reloj (PER2). Por último, se activan los NPV, y se induce la expresión de Per1, probablemente en respuesta a señales enviadas desde los NSQ. 3V: tercer ventrículo. QO: quiasma óptico. BHE: barrera hematoencefálica.



## **CAPÍTULO II**

**Interacción entre los  
sistemas inmune y  
circadiano.**

**Respuesta circadiana a  
dosis altas de LPS.**



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **Hipótesis general:**

*La diferencia horaria en el porcentaje de muerte por shock séptico inducido por dosis altas de LPS, se asocia a la respuesta térmica e inmune diferencial desencadenada de acuerdo al momento del día en el cual es administrado.*

## **Hipótesis específicas:**

- La hipotermia inducida por la inoculación de altas dosis de LPS varía de acuerdo al momento del día en el que éste se administra.
- Las regiones hipotalámicas relacionadas con la regulación de la temperatura corporal y con la respuesta inmune se activan en forma diferencial de acuerdo al horario de inoculación del LPS.
- La inoculación de LPS induce cambios en la composición sérica que dependen de la hora de administración, y que podrían ser la causa de la respuesta diferencial al shock séptico.
- La respuesta inmune se activa en forma diferencial de acuerdo al horario en el que se administra la endotoxina.
- Los animales deficientes del receptor de TNF- $\alpha$  (TNFR1 KO) presentan diferencias en la respuesta horaria diferencial a las dosis altas de LPS, con respecto a los animales WT.
- La desincronización circadiana abole la respuesta horaria diferencial a la inoculación de dosis altas de LPS.

El **objetivo general** en el que se enmarca el presente capítulo es el estudio de la respuesta termoregulatoria e inmune a la inoculación de dosis altas de LPS (inductoras de shock séptico) al final del día o a mitad de la noche, analizando nuevamente la participación de TNF- $\alpha$  como mediador entre los sistemas circadiano e inmune.

**Objetivos específicos:**

1. Estudiar la respuesta termoregulatoria a las dosis altas de LPS administradas al final del día o mitad de la noche.
2. Evaluar la activación de los NPV, del APO y de los NSQ en respuesta al shock endotóxico inducido a ambos horarios.
3. Analizar si la diferencia en la susceptibilidad al shock endotóxico, está dada por niveles diferenciales de citoquinas, glucocorticoides y endocannabinoides en suero y tejidos periféricos luego de la administración de LPS a diferentes horarios.
4. Estudiar la activación de células inmunes en animales con shock endotóxico inducido a distintos horarios.
5. Evaluar la respuesta horaria diferencial a dosis altas de LPS en animales TNFR1 KO.
6. Estudiar la respuesta circadiana al shock endotóxico en animales desincronizados.



## **II.1 INTRODUCCIÓN**



## **II.1.1 Sepsis y shock séptico**

### **II.1.1.1 Breve introducción a la problemática**

La sepsis es uno de los síndromes más antiguos de la medicina, que surge cuando la respuesta del organismo a una infección termina dañando los propios tejidos y órganos. Galeno consideraba que se trataba de “un evento loable necesario para que se curen las heridas” (Funk 2009). Pero más tarde, cuando Pasteur, entre otros científicos, demostró la existencia de microorganismos que eran causantes de una gran parte de las enfermedades (teoría germinal de las enfermedades infecciosas) se comprendió que en realidad la sepsis era una infección sistémica, por lo que fue frecuentemente descrita como “envenenamiento de la sangre”. De esta forma se descubrió que se trataba de una infección con un patógeno que era capaz de diseminarse a la circulación (Angus & van der Poll 2013). Más recientemente se observó que la teoría germinal no explicaba exactamente la patogénesis de la sepsis, ya que muchos pacientes fallecían aun cuando se había erradicado el patógeno del organismo con antibióticos. Por lo tanto, se sugirió que no era el microorganismo invasor, sino la respuesta del propio huésped quien dirigía la patogénesis de esta enfermedad (Cerra 1985).

Las definiciones de sepsis existentes hasta hace algunos años eran muy generales y dificultaban el diagnóstico de la enfermedad. Recientemente se ha llegado a un consenso y se la definió como una disfunción multiorgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del huésped al patógeno invasor. En casos en los que se sospecha la presencia de una infección, incluso cuando la disfunción multiorgánica es leve, se asocia a una mortalidad hospitalaria mayor al 10% (Singer 2016). Por otro lado, el shock

séptico se define como un estado séptico complicado por alteraciones circulatorias (hipotensión) y metabólicas, lo que aumenta sustancialmente la tasa de mortalidad de los pacientes (Singer 2016).

Se estima que la sepsis es una de las principales causas de mortalidad alrededor del mundo, tanto en países de altos como de bajos ingresos. En Argentina, un censo realizado en 2003 estimó un 43% de mortalidad a causa de sepsis en pacientes en la Unidad de Cuidados Intensivos, y se estima que cada año mueren alrededor de 10.000 personas a causa de esta condición en el país (Paricahua 2017). Por otra parte, en Estados Unidos, la incidencia de la sepsis severa es de 3 cada 1000 habitantes; los ingresos hospitalarios por sepsis han superado a los de infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (Seymour 2012), y la mortalidad dentro de los hospitales es de entre un 25-30% de los pacientes sépticos (Cohen 2015). Dadas estas cifras, resulta de gran interés estudiar en mayor profundidad los mecanismos desencadenados durante esta patología, con el fin de encontrar un blanco terapéutico que pueda mejorar el pronóstico de los tratamientos actuales, teniendo en cuenta que la respuesta del huésped posee un rol fundamental en el desarrollo de esta enfermedad.

### **II.1.1.2 Características clínicas de la enfermedad**

Las manifestaciones clínicas varían con el sitio de la infección (generalmente el tracto respiratorio o urinario), el organismo invasor, el tipo de disfunción aguda orgánica, la salud previa del paciente y el tiempo de detección y tratamiento. Los criterios de diagnóstico de la sepsis o shock séptico incluyen la sospecha de infección y, adicionalmente, 2 o más de los siguientes síntomas: fiebre (temperatura central mayor a 38.3°C), hipotermia (temperatura menor a

36°C), ritmo cardíaco elevado, estado mental alterado, retención de líquidos, aumento de la frecuencia respiratoria, hiperglicemia, alteraciones en variables inflamatorias (aumento de niveles de leucocitos y de proteína C reactiva, entre otros), alteraciones de variables hemodinámicas (por ejemplo, hipotensión), variables causadas por la disfunción orgánica (aumento de los niveles de creatinina, anormalidades en la coagulación, entre otros) y variables de perfusión tisular (como aumento en los niveles de lactato) (Angus & van der Poll 2013).

Aún no se conocen las causas exactas que llevan a la falla multiorgánica, pero la falta de oxigenación en los tejidos tendría un importante rol. Muchos factores contribuyen a la escasez de oxígeno, como la hipotensión, una reducción en la deformabilidad de los eritrocitos y la trombosis microvascular. Adicionalmente, la inflamación puede causar alteraciones en el endotelio vascular, lo que se ve acompañado por muerte celular y pérdida de la integridad de la barrera, lo cual induce edemas subcutáneos y en las cavidades corporales (Goldenberg 2011). El daño mitocondrial causado por el estrés oxidativo también altera la utilización del oxígeno celular (Galley 2011). Por último, el daño mitocondrial produce la liberación de mtDAMPs (patrones moleculares asociados a daño mitocondrial), que son capaces de activar neutrófilos y esto, a su vez, causar mayor daño tisular (Zhang & Yao 2010).

Como se puede observar, se trata de una patología multisintomática y compleja. Sería fundamental poder diferenciar cuáles síntomas se relacionan con casos de sepsis más severos, que terminan en la mortalidad del paciente, de aquellos que son compatibles con un mejor pronóstico. De esta forma se podrían realizar tratamientos más personalizados, dirigidos a prevenir los eventos que se desarrollan en cada caso particular.

### **II.1.1.3 Respuesta inflamatoria desencadenada por la sepsis**

Al ingresar el patógeno al organismo, se activa la respuesta inmune innata del huésped provocando un aumento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias conocido como “tormenta de citoquinas” (Chen 2008). Como ya se explicó en la sección 2.1 de la Introducción general, las endotoxinas presentes en las paredes bacterianas son reconocidas por los RPPs presentes en las células inmunes, y esta interacción desencadena la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Esta respuesta es conocida como síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, por sus siglas en inglés). La severidad con la que se desencadena esta respuesta depende de la presencia de otras enfermedades en el paciente, la carga del patógeno y su virulencia (Hotchkiss & Karl 2003). Como en toda respuesta inflamatoria se desencadena una serie de eventos que incluyen el reclutamiento de células al sitio de infección por parte de las quemoquinas, la fagocitosis y el daño vascular (Casey 2000). Pero la respuesta inflamatoria no se limita solo al sitio de infección, sino que los niveles elevados de IL-6 inducen la producción de proteína C reactiva en el hígado, una proteína de fase aguda con funciones anti-coagulantes y anti-apoptóticas (entre otras), que se puede utilizar como biomarcador para predecir una posible septicemia (Cinel & Opal 2009). Esta proteína, junto con otras que participan en las vías de coagulación, inducen alteraciones en el sistema de coagulación de los pacientes (Levi 2010; Angus & van der Poll 2013).

Sin embargo, hoy en día se sabe que la infección desencadena una respuesta muy compleja, variable y prolongada, en la cual participan tanto mecanismos pro-inflamatorios como anti-inflamatorios. Por un lado, los pro-inflamatorios contribuyen a eliminar la infección y los anti-inflamatorios a

recuperar los tejidos. Pero por el otro lado, demasiada inflamación puede ocasionar daño tisular, y un exceso de anti-inflamación puede desencadenar infecciones secundarias (van der Poll & Opal 2008). Se han observado al menos 3 mecanismos de inmunosupresión en los pacientes. Por un lado, la depleción por apoptosis de células B y T de nódulos linfáticos, bazo, intestino, pulmones, entre otros tejidos. Un potencial mecanismo de esta apoptosis podría ser a través de la secreción endógena de glucocorticoides (Ayala 1995; Green 2000). Las células apoptóticas pueden inducir un estado de anergia sobre los linfocitos (Voll 1997), que podría disminuir la capacidad de producción de citoquinas pro-inflamatorias, lo cual fue observado en pacientes sépticos (Boomer 2011). Adicionalmente, también se evidenció la depleción y alteración en la función de macrófagos y células dendríticas, lo cual altera la presentación de antígenos a linfocitos T (Warner & Moldawer 2008; Hotchkiss 2009). Por otro lado, la alteración en las funciones de las células fagocíticas, reduce la resistencia contra los patógenos invasores, causando una inadecuada contención de las bacterias comensales (como *Pseudomonas* o *E. coli*) y no comensales (como *Staphilococcus aureus*) y una disminución en la respuesta contra hongos (Bosman 2014). Las moléculas secretadas durante la respuesta inmunosupresora comprenden la citoquina IL-10, el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) y TGF- $\beta$  (Marchant 1994; Marie 1996). Se ha observado que los niveles de IL-10 correlacionan con peores pronósticos para el paciente (Gogos 2000).

Por lo tanto, aún no se encuentran del todo dilucidados los mecanismos inflamatorios específicos que se desarrollan durante esta patología. Sería importante diferenciar a partir de los síntomas clínicos marcadores inflamatorios

que nos permitan discriminar entre los casos de sepsis con mejor y peor pronóstico.

#### **II.1.1.4 Rol del TNF- $\alpha$ durante la sepsis**

Como ya se mencionó anteriormente, la respuesta desencadenada por la invasión del patógeno induce la liberación de grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias, entre las cuales se encuentra TNF- $\alpha$ . La llegada de esta citoquina a circulación genera vasodilatación, la cual lleva a hipotensión, y al incremento en la permeabilidad vascular, que induce la pérdida de volumen plasmático (Murphy 2017).

Adicionalmente, esta citoquina también desencadena la cascada de la coagulación en una gran cantidad de capilares sanguíneos distribuidos a lo largo del organismo (conocido como coagulación intravascular diseminada), reclutando una gran cantidad de proteínas de dicha cascada. La coagulación intravascular diseminada conduce generalmente a la falla de órganos vitales, como los riñones, corazón, hígado y pulmones (Aderka 1991; Okamoto 2016).

En modelos animales, la administración sistémica de TNF- $\alpha$  produce la mayor parte de los síntomas y signos de la sepsis (Tracey 1988). En tanto que la falta de señalización mediada por esta citoquina, como en ratones deficientes del receptor de TNF- $\alpha$  o a través de la administración de su receptor soluble, genera cierto nivel de resistencia al shock séptico (Tracey 1987; Mohler 1993; Pfeffer 1993; Guo 2009).

Sin embargo, en pacientes, los tratamientos con bloqueantes de la señalización por TNF- $\alpha$  tienen resultados controversiales. Mientras que algunos investigadores han encontrado que el tratamiento con anticuerpos anti-TNF $\alpha$  es



capaz de reducir la tasa de mortalidad (Lv 2014), otros grupos observaron que el tratamiento con receptores solubles (TNFRs) no la reducía, y que, por el contrario, altos niveles de esta molécula correlacionaban con un aumento en la mortalidad (Fisher 1993).

**Los resultados contradictorios encontrados en relación a TNF- $\alpha$  podrían deberse a que esta citoquina tenga un rol diferente de acuerdo a la severidad del cuadro séptico. Esto nos indica, una vez más, que es de suma importancia poder diferenciar entre los cuadros que terminan en la muerte del paciente de aquellos en los que el paciente sobrevive.**

#### **II.1.1.5 Alteraciones de la temperatura corporal en respuesta a la sepsis**

Aunque la fiebre es característica en la respuesta a un cuadro de septicemia, muchas veces los pacientes presentan hipotermia, siendo éste último un marcador de peor pronóstico (Remick & Xioa 2006; Rumbus 2017). Sin embargo, tanto estudios en modelos animales como en pacientes, sugieren que la hipotermia puede tener un rol protector durante el shock séptico y que disminuir la temperatura del paciente podría ser terapéuticamente beneficioso (Garami 2018).

En modelos animales se ha observado que una de las principales características de la respuesta a dosis altas de LPS es el descenso de la temperatura corporal, para activar la producción metabólica de calor (Romanovsky 2003). Se considera que TNF- $\alpha$  es una de las citoquinas criogénicas (mediador inmune capaz de disminuir la temperatura corporal) más importantes, aunque también puede actuar como una molécula pirogénica. Se

crea que a bajas concentraciones puede causar respuesta febril, mientras que a concentraciones medias o altas induce hipotermia (Bibby & Grimble 1989).

La temperatura corporal es controlada por circuitos neuronales que permiten que se mantenga su homeostasis durante los cambios de temperatura ambiental y provocan su alteración frente a respuestas inflamatorias (Morrison 2016). El hipotálamo contiene los principales componentes de estos circuitos. En particular, el área preóptica (APO) tiene un importante rol en la termorregulación, al detectar la temperatura cerebral local como así también al recibir información a partir de termorreceptores ubicados en la piel y otras partes del organismo (Boulant 1998; Morrison 2018). Otras regiones hipotalámicas, como los NPV y los NSQ, también participan en la termorregulación (Wanner 2013; Guzman-Ruiz 2015). Se ha demostrado que dosis de LPS capaces de generar una hipotermia leve en ratas, producen un aumento en la expresión del gen cFos, el mencionado marcador de activación neuronal, en distintas zonas del cerebro, incluyendo APO Y NPV (Hare 1995; Wanner 2013). Adicionalmente, la lesión de los NPV atenúa la hipotermia generada a causa del LPS (Almeida 2006). En cuanto a los NSQ, se ha observado que se activan en respuesta a la hipotermia inducida por la restricción alimentaria junto con la exposición a ambientes fríos (Uchida 2014).

### **II.1.2 Modelos animales para el estudio de la sepsis**

En la actualidad existen tres modelos para inducir el estado séptico en roedores: a través de la administración de una toxina (como el LPS) por vía intravenosa o ip, inoculando una bacteria viva o alterando alguna de las barreras de protección del organismo (el más utilizado es a través de la punción cecal)

(Chen 2008). Cada uno de estos modelos reproduce parte de los síntomas observados en pacientes con sepsis aunque ninguno lo hace completamente.

En este trabajo se utilizará como modelo de esta patología la administración de una dosis de 20 mg/kg de LPS por vía ip. Se ha demostrado que dosis similares de esta endotoxina inducen altas tasas de mortalidad en roedores (mayores al 70%; (Li 2014; Liao & Lin 2015; Ramos-Benitez 2018)) y la mayoría de los signos característicos de esta patología. Se ha observado una fuerte inducción de citoquinas pro-inflamatorias (Ogawa 2016; Ramos-Benitez 2018), alteraciones en la coagulación (Takehara 2017), desarrollo de hipotermia (Saito 2003; Nautiyal 2009), alteraciones vasculares e hipotensión (Chuaiphichai 2016) y desarrollo de la respuesta inmunosupresora (Cordoba-Moreno 2018), entre otros.

La mayoría de los animales de laboratorio utilizados como modelos de endotaxemia son más resistentes al LPS que los humanos, razón por la cual es necesaria la administración de dosis altas de LPS (generalmente mayor a 10 mg/kg) (Chen 2008). Sin embargo, los efectos de cada dosis dependen de la cepa bacteriana productora del LPS y de la cepa de ratones utilizada. El modelo a utilizar en este trabajo de tesis resulta ventajoso debido a su sencillez y a que, como ya mencionamos, desencadena gran parte de los signos de la septicemia.

### **II.1.3 Regulación nerviosa de la respuesta inflamatoria durante la sepsis**

Como prácticamente en todas las patologías, existe evidencia de que el SNC participa en el desarrollo de la sepsis, entre otras cosas porque aumentan los niveles de moléculas pro-inflamatorias en este tejido (Meneses 2019). Por

ejemplo, se ha demostrado que la inyección icv del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) aumenta el porcentaje de supervivencia de ratas sépticas (Wahab 2016). Adicionalmente, en estudios con pacientes se observó que la sepsis puede causar daño cognitivo y estructural del SNC, tanto a corto como largo plazo en adultos (Iwashyna TJ 2010); mientras que en niños que pasaron por esta patología, se evidenció un bajo desempeño escolar (Kaur 2016).

Como ya se discutió en la sección 3.1.2 de la Introducción general, hay una gran evidencia de que en patologías inflamatorias - como por ejemplo la sepsis - la respuesta inmune está regulada por el sistema nervioso autónomo. Tracey y colaboradores fueron los primeros en estudiar el reflejo inflamatorio, entre ellos de la sepsis, observando que la activación del nervio vago desencadena la producción de acetilcolina, la cual interacciona con su receptor en macrófagos, disminuyendo la liberación de mediadores como TNF- $\alpha$  (Andersson & Tracey 2012). En un modelo de sepsis causado por punción cecal, se observó que tanto la utilización de un agonista sintético del receptor de acetilcolina en macrófagos, como la estimulación del nervio vago, disminuye la respuesta inflamatoria y aumenta la supervivencia de los ratones sépticos (Borovikova 2000; Andersson & Tracey 2012).

Adicionalmente, como ya se mencionó reiteradas veces a lo largo de esta tesis, la respuesta inflamatoria actúa como un estresor capaz de activar el eje HPA, la cual culmina en la secreción de glucocorticoides en la glándula adrenal (Kasahara & Inoue 2015). Estos poseen un gran número de funciones, entre ellas: la estimulación de la gluconeogénesis hepática, inhibición del consumo de glucosa en tejidos periféricos, disminución de la inflamación y de otras funciones inmunes, regulación de la actividad mitocondrial, regulación de la apoptosis

celular, inhibición de la secreción de hormonas y neuropéptidos, etc. (Stahn & Buttgereit 2008; Ayroldi 2012). En modelos animales la estimulación del eje HPA, contribuye a un aumento en la resistencia al shock endotóxico (Dejager 2010; Gilibert 2014). Sin embargo, el tratamiento de pacientes sépticos con glucocorticoides no siempre lleva a un incremento en la sobrevida, muchas veces generándose resistencia al tratamiento (Cronin 1995; Annane 2009; Dendoncker & Libert 2017).

Por último, también ha sido demostrado que la producción de citoquinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno durante la sepsis, pueden provocar alteraciones de la BHE, aumentando su permeabilidad (Danielski 2018). Las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  participarían de este proceso (Tsao 2001; Mina 2014) en el cual aumenta la expresión endotelial de selectinas y moléculas de adhesión, que permiten el ingreso de leucocitos al cerebro (Bohatschek 2001; Hofer 2008). Por otra parte, las especies reactivas de oxígeno liberadas durante la sepsis, por los neutrófilos activados (entre otros), pueden alterar la integridad de la BHE (Yokoo 2012), lo que aumentaría su permeabilidad y permitiría el paso de moléculas al SNC.

Como se puede observar existen muchísimas evidencias de los múltiples procesos involucrados en el desarrollo y la complejidad de esta patología. **El SNC podría actuar como un modulador de este proceso, que se activa de acuerdo a las señales periféricas que recibe.** Por lo que resulta de gran interés caracterizar los mecanismos de comunicación entre este sistema y la periferia durante la sepsis.

A todo esto, además, se debe adicionar que, como ya describimos anteriormente, muchos de los factores involucrados en la patogénesis de la

sepsis poseen ritmos en sus niveles y funciones, lo cual describiremos a continuación.

#### **II.1.4 Interacciones inmune-circadianas durante el shock séptico**

Hacia 1960, Halberg y colaboradores demostraron que existe una resistencia diferencial al shock séptico a lo largo del día, siendo que los ratones estimulados con dosis altas de LPS al final del día poseen una mayor tasa de mortalidad que aquellos estimulados a mitad de la noche (Halberg 1960). Posteriormente, Hrushesky y colaboradores realizaron un experimento análogo administrando TNF- $\alpha$  por vía intravenosa, obteniendo similares resultados en la distribución de los porcentajes de mortalidad en distintos horarios (Hrushesky 1994). Más tarde, estos hallazgos se han extendido a otros modelos de infección. Por ejemplo, se observó que animales infectados con *Salmonella entérica* poseen una mayor capacidad de deshacerse de esta bacteria si la infección inicial se produjo durante la noche (Bellet 2013).

Adicionalmente, se ha observado una relación entre el shock séptico y la maquinaria molecular del reloj circadiano. Ratones que carecen del gen reloj Per2 (PER2 KO) son más resistentes al shock séptico inducido por LPS, mostrando menores niveles de IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  (Liu, J. 2006) y de glucocorticosteroides en suero (Wang, J. 2015). De forma similar ratones que carecen de la proteína reloj CLOCK presentan una mayor supervivencia luego de la inducción de sepsis polimicrobiana causada por ligación cecal y punción. Además, tanto en estos últimos como en los PER2 KO se observó la pérdida de la diferencia diaria en la tasa de mortalidad (Liu, J. 2006; Wang 2016). Ha sido

sugerido que CLOCK, junto con Bmal1 están involucrados, en la regulación de la enzima Star, la cual participa en el proceso de síntesis de glucocorticoides (Wang, J. 2015).

En relación a pacientes, se ha observado que la inoculación con *Salmonella abortus* al final del día, induce mayores niveles de cortisol en sangre, comparada con la administración al principio del día (Pollmacher 1996). Por otra parte, el ritmo de expresión de genes reloj y de secreción de melatonina (hormona fuertemente relacionada al sistema circadiano) se encuentran alterados en los primeros estadios de la sepsis (Li 2014); en tanto que los niveles de ésta última correlacionan con la mortalidad (Lorente 2015). En modelos animales se demostró que la falta de receptores para melatonina genera una mayor respuesta inflamatoria en ratones (Kleber 2014); mientras que la administración de melatonina exógena aumenta la sobrevivencia (Fink 2014).

**Estas evidencias indicarían que el reloj circadiano y su control sobre ciertas funciones que se encuentran alteradas durante el cuadro séptico, podría tener un importante rol en la patogénesis de esta enfermedad.**

#### **II.1.4.1 Efectos de la desincronización circadiana en la respuesta séptica**

Existen numerosas evidencias en animales de que la desincronización circadiana es capaz de alterar las funciones inmunes. La desincronización de los ritmos circadianos mediante distintos protocolos (como lesión de los NSQ o *jet-lag* crónico) genera un incremento en la respuesta inflamatoria desencadenada por la administración de LPS (Castanon-Cervantes 2010; Adams 2013; Guerrero-Vargas 2014). Adicionalmente, se ha demostrado que animales

sometidos a luz constante (modelo de arritmia circadiana) tienen menores probabilidades de sobrevivir a un shock séptico (Carlson & Chiu 2008).

En humanos, se ha observado un aumento en los niveles de distintas moléculas inmunes, como la proteína C reactiva, y las citoquinas IL-1 e IL-6 en personas privadas de sueño (Shearer 2001; Frey 2007). Estos datos son de suma importancia, ya que las unidades de cuidados intensivos, donde se encuentran internados generalmente los pacientes con shock séptico, poseen luz constante. Esta condición es desincronizante y por lo tanto, puede traer más complicaciones al estado inflamatorio del paciente.

**A pesar de las numerosas observaciones acerca de las diferencias diarias en la respuesta a la sepsis y en los efectos del sistema circadiano sobre esta patología, aún se desconocen las causas que generan esta respuesta diferencial. Resulta de gran interés estudiar en mayor profundidad la interacción entre el reloj circadiano y los factores desencadenados durante la sepsis, con el fin de comprender y diferenciar las respuestas que terminan en la mortalidad, de aquellas que son compatibles con la sobrevivencia del paciente.**



## **II.2 MATERIALES Y**

## **METODOLOGÍA**

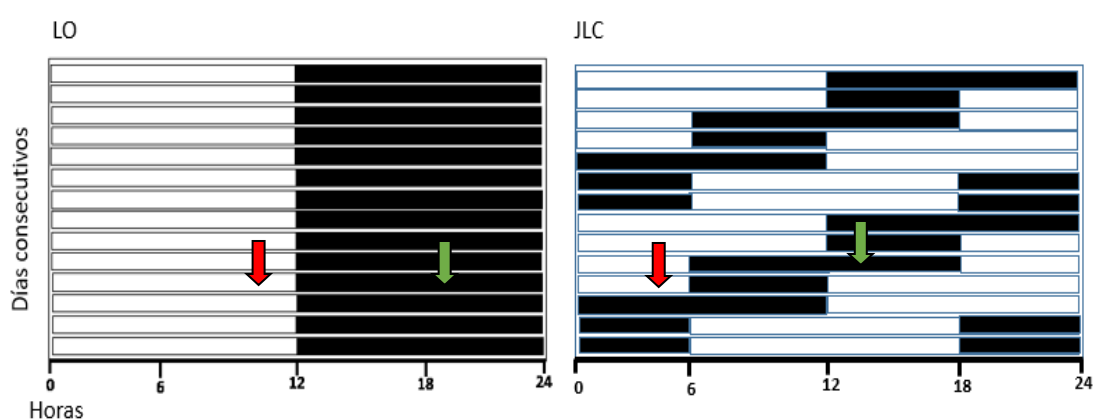


## II.2.1 Animales y condiciones de alojamiento.

Se utilizaron los mismos animales y condiciones de alojamiento descritas en la sección I.2.1 del Capítulo 1. Para este modelo específicamente, los animales fueron manipulados diariamente durante la semana previa a cada experimento, para evitar una posible interferencia del estrés.

### II.2.1.1 Protocolo experimental de desincronización circadiana

Para generar desincronización circadiana en los animales se utilizó un esquema lumínico desarrollado previamente en el laboratorio, basado en un protocolo de *Jet Lag* Crónico Experimental (JLC<sup>6/2</sup>; (Casiraghi 2012)). Dicho protocolo consiste en adelantar 6 h el encendido y el apagado de las luces cada dos días, como se esquematiza en la Figura II.2.1. De esta manera se logra modificar las condiciones de sincronización de los animales sin alterar la cantidad total de luz que reciben los animales.



**Figura II.2.1. Esquemas de iluminación utilizados.** Se pueden observar los esquemas de luz utilizados para los experimentos correspondientes al capítulo 2. A la izquierda se muestra el esquema LO, que consiste en 12h de luz y 12h de oscuridad (LO12:12). A la derecha se observa el esquema de JLC<sup>6/2</sup>, que consiste en adelantos de 6 horas en el encendido y apagado de las luces, cada dos días, partiendo de un ciclo LO12:12. Las flechas rojas indican el momento de inyección de LPS a ZT11, mientras que las verdes a ZT19.

## **II.2.2 Diseño experimental**

En los experimentos realizados en condiciones de LO, los animales fueron inyectados a ZT11 o 19 con una dosis de 20 mg/kg de LPS (*Escherichia coli* serotipo 0111:B4 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o VEH. En el caso de los experimentos realizados en condiciones de JLC<sup>6/2</sup>, la administración de dosis altas de LPS o VEH se realizó 3 semanas después del comienzo del protocolo JLC<sup>6/2</sup>. La administración a ZT11 se realizó durante el día anterior a la noche de 6h, mientras que la administración a ZT19 fue durante la noche de 12h previa al mencionado día. Dicha elección se realizó a fin de utilizar los momentos más similares al esquema de LO, y a que la noche de 6 h llega hasta ZT18. Se pueden observar los momentos de inoculación en los actogramas de la Figura II.2.1, donde las flechas rojas indican la inyección a ZT11, mientras que las verdes la inyección a ZT19.

En todos los casos las muestras de suero y tejido se tomaron 2h después de la estimulación con LPS o VEH, con excepción del experimento de análisis de la BHE y el de transplante de suero, que se desarrollan más adelante. Para la extracción, se le administró a los animales una mezcla de isoflurano (USP, Piramal Healthcare) con oxígeno (porcentaje de isoflurano: 5%, flujo de oxígeno: 400 ml/min), por vía inhalatoria, utilizando un equipo de anestesia gaseoso (Surgivet®).

### **II.2.3 Registro de la temperatura corporal.**

Para el análisis de la temperatura corporal, se tomaron fotos individuales utilizando la cámara termográfica FlirOne (*Flir Systems*) acoplada a un teléfono celular Samsung S7. Esta cámara provee de imágenes térmicas y permite leer temperaturas de entre -20 y 120°C, con una resolución de 0.1°C. Las fotografías se tomaron 1 hora antes, al momento del estímulo, y luego cada 2 horas, durante 20 horas. Para la toma de la fotografía el animal fue extraído de la jaula y colocado sobre un enrejado que se encontraba sobre una plataforma forrada con tela negra. La cámara se fijó a una altura constante durante todos los experimentos. Las fotos fueron luego analizadas utilizando un algoritmo especialmente diseñado en Matlab, para el cálculo automático del máximo, mínimo, promedio y localización del máximo de temperatura del animal en cada foto. Los análisis de las curvas de temperatura se realizaron utilizando el máximo de temperatura calculado para cada foto, el cual se observó que se encontraba siempre en la cabeza del animal.

### **II.2.4 Recolección y procesamiento de muestras**

#### **II.2.4.1 Recolección de suero.**

Cuando se comprobó que los animales perdieron los reflejos motores a causa de la anestesia (ver sección II.2.2), fueron colocados con la región abdominal hacia arriba, se rociaron con etanol al 70% y se les extrajo sangre por punción cardíaca insertando una jeringa con una aguja 25G a 45° en el ventrículo izquierdo del animal. A continuación, la sangre se centrifugó durante 10 minutos

a 6000 g, y se recuperó el suero, el cual fue almacenado inmediatamente a -80°C.

#### **II.2.4.2 Extracción de proteínas de tejido.**

Los animales fueron anestesiados (ver sección II.2.2) y luego sacrificados por dislocación cervical. Se extrajo el hígado y el bazo de cada animal, los cuales fueron colocados en PBS con un cóctel de inhibidores de proteasas (*P8340-Sigma Aldrich*) en una concentración 1/100. Luego, se homogenizó la muestra utilizando un vástago y se colocó 15 minutos en hielo. A continuación se centrifugó durante 15 minutos a 12000 r.p.m., se separó el sobrenadante y se guardó a -80°C.

#### **II.2.4.3 Extracción de ARN de tejido y Retrotranscripción**

Se siguió el protocolo especificado en la sección I.2.5.1 del Capítulo 1, con la diferencia que el tejido de hígado se recolectó en 300 µl solución *Trizol*® (*Life Technologies*), en condiciones libres de RNAsas; mientras que el tejido de APO se colocó en 100 µl de dicha solución. El tejido de APO se extrajo bajo la lupa teniendo en cuenta las coordenadas del atlas de cerebro de ratón Paxinos, 2001. El protocolo para la cuantificación del ARN y la síntesis del ADNc es también el desarrollado en la sección I.2.5.1. El ADNc se sintetizó en ambos casos a partir de 1000 ng de ARN total.

### **II.2.5 Transferencia de suero**

Se inocularon animales con 20 mg/kg de LPS a ZT11 o ZT19, y dos horas después (ZT13 o ZT21, respectivamente) se les extrajo la sangre para la obtención del suero, como se explica en la sección II.2.4.1. El suero se pasó por un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ . A continuación dicho suero se inyectó por vía intraperitoneal en animales *naive* a ZT13. Cada animal recibió el suero correspondiente a dos animales.

### **II.2.6 Cuantificación de los niveles de TNF- $\alpha$ por ELISA.**

Para cuantificar los niveles de TNF- $\alpha$  en suero (en el caso de las muestras tomadas en protocolo de JLC<sup>6/2</sup>), hígado y bazo se utilizó el Mouse TNF (Mono/Mono) ELISA Set (*BD OptEIA, BD Bioscience*). Las muestras de suero se diluyeron 1/2, los extractos proteicos de hígado 1/20 y los de bazo 1/10, en buffer de dilución. Para la preparación del buffer de dilución se utilizó Suero Fetal Bovino Biotecnológico (*Internegocios*). Se siguieron las indicaciones del fabricante, con la excepción de que las muestras se incubaron *overnight*. Luego, del revelado se midió la absorbancia de la placa en el equipo *Cytation 5 Imaging Reader* (BioTek Instruments).

### **II.2.7 Cuantificación de citoquinas por Citometría de Flujo.**

Para realizar la medición de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-10, y la quemoquina CCL-2 de las muestras de suero recolectadas se utilizó

un Kit comercial para medición de citoquinas de ratón (*Citometric Bead Array Mouse Inflammation Kit- Becton, Dickinson and Company*). Se siguió el mismo protocolo que se informa en la sección I.2.4.2 del Capítulo 1, al igual que para el análisis de los datos obtenidos mediante este protocolo.

### **II.2.8 Cuantificación de los niveles de corticosterona en suero.**

Los niveles de corticosterona en suero se midieron en el Servicio Tecnológico de Alto Nivel de Medición de Corticosterona, que funciona en el Laboratorio de Endocrinología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Para ello se utilizó la técnica de Radioinmunoensayo (RIA). Las muestras correspondientes a los animales inoculados con vehículo se diluyeron 1/10, mientras que las de los animales inyectados con LPS, 1/25. Luego, se procedió con dos extracciones sucesivas con Diclorometano y a continuación se analizaron. Se utilizó una curva estándar con un rango de entre 31 a 1000 ug/100 ul.

### **II.2.9 Cuantificación de los niveles del endocanabinoide 2-AG en suero.**

Se colocaron 500 ul del suero de cada ratón en un vial de vidrio, junto con 60 pmoles del estándar del endocanabinoide 2-AGd5 (Cat. 362162, *Cayman Chemicals*). La masa a utilizar del estándar se obtuvo realizando una curva y calculando los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Se agregó 2 ml de Acetato de Etilo (calidad HPLC) y se mezcló durante un minuto utilizando un *vórtex*. A continuación se centrifugó a 1400g por 10 min. Se obtuvieron 2



fases: una acuosa y una orgánica. Esta última se pasó a un tubo de vidrio limpio y se secó utilizando N<sub>2</sub> gaseoso. Estas muestras fueron enviadas al Servicio de Espectrometría de Masas de Inmet (Ingeniería Metabólica SA), en el predio CCT de Rosario, Santa Fé. Allí se resuspendieron en una solución 1:1 de agua: metanol, y se inyectaron en un equipo LC-MS/MS.

#### **II.2.10 Cuantificación de los niveles de LPS en suero.**

Las muestras de suero fueron incubadas a 70°C durante 10 minutos en un baño seco. A continuación se realizó una dilución 1/100000 y se continuó con las indicaciones del fabricante. Se utilizó el ensayo *Limulus Amebocyte Lysate Endochrome (Charles River)*, para el cual se utilizaron tips, tubos y placas libres de endotoxinas. Se colocaron 50 µl de la muestra o estándar diluido en una placa de 96 wells y se incubó en una estufa a 37°C durante 5 minutos. A continuación se agregó 50 µl de la solución conteniendo el lisado de amebocitos de *Limulus*, y se incubó 5 minutos a 37°C. Por último, se agregaron 100 µl de la solución de sustrato en buffer Tris y se incubó a 37°C durante 5 minutos. La reacción se frenó con el agregado de 100 µl de una solución de ácido acético al 20%. Se leyó la absorbancia de la placa a 405 nm en un espectrofotómetro. Para el análisis, a los valores de la curva estándar se les aplicó una regresión de asociación exponencial de una fase, calculada mediante el software *Graphpad 7.0*.

### **II.2.11 Cuantificación de los niveles de expresión de TNF- $\alpha$ y TNFR1 en tejido.**

#### **PCR en Tiempo Real**

Con las muestras de ADNc provenientes del tejido de hígado y APO, se realizó una *Real-Time* PCR utilizando el equipo *SmartCycler II Thermal Cycler Automated Real-Time PCR System (Cepheid)* y la mezcla de reacción *Master Mix qPCR (Productos BioLógicos, Argentina)*. Para la normalización se utilizó el gen HPRT. Los oligonucleótidos utilizados fueron: TNFR1-F 5'-ACC AAG TGC CAC AAA GGA AC-3', TNFR1-R 5'-ATT CTG GGA AGC CGT AAA GG-3', TNF-F 5'-GAC AGT GAC CTG GAC TGT GG-3', TNF-R 5'-GAG ACA GAG GCA ACC TGA CC-3', HPRT-F 5'-TGT TGG ATA CAG GCC AGA C-3', HPRT-R 5' TGG CAA CAT CAA CAG GAC TC-3'. Para el análisis de la expresión relativa se utilizó el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **II.2.12 Análisis de los niveles de la proteína cFos por inmunomarcación en hipotálamo.**

#### **II.2.12.1 Perfusiones**

Se utilizó el mismo protocolo detallado en la sección I.2.6.1 del Capítulo 1, pero los animales fueron anestesiados con Isoflurano gaseoso.

#### **II.2.12.2 Inmunohistoquímica para cFos**

Se obtuvieron cortes coronales de 30  $\mu\text{m}$  de los cerebros perfundidos y preservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , utilizando un criostato por congelación. Estos cortes fueron lavados 2 veces por 10 minutos con PBS 0,01 M y 3 veces por 15 min con PBST,

antes de incubarlos por 1 hora con la solución de bloqueo (leche descremada al 10% en PBST). Finalizado el bloqueo, los cortes se lavaron 3 veces con PBST por 10 min e incubaron con el anticuerpo primario anti-cFos (hecho en conejo – *Millipore*), en una concentración de 1:1000 en PBST, por 24 hs a 4°C. Posteriormente se lavaron 4 veces por 10 min con PBST e incubaron con un anticuerpo secundario universal biotinilado en una concentración de 1:200 en PBST (*Kit ABC elite, Vector Labs*), durante 90 minutos. Luego se lavaron con PBST, transfirieron a PBS e incubaron con la solución de bloqueo de la peroxidasa endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en PBS). A continuación se realizaron lavados con PBS y se incubó con el complejo avidina/biotina-peroxidasa (*Kit ABC elite, Vector Labs*) en PBS durante 1 hora. Para visualizar la inmunoreactividad, por reacción de la enzima peroxidasa se utilizó diaminobenzidina como agente oxidante, utilizando VIP (sustrato de la peroxidasa, *Vector Labs*) en PBS. Luego, los cortes fueron montados en vidrios cargados positivamente, secados y deshidratados por incubación durante 30 segundos en soluciones de alcoholes de concentración creciente (Etanol 70%, 96% y 100%) y en sustituto de xileno durante 1 minuto. El cubreobjetos se colocó con medio de montaje sintético (Bálsamo de Canadá - *Biopack*).

### **II.2.12.3 Cuantificación de células positivas**

Se obtuvieron fotografías de los cortes de cerebro tratados por inmunohistoquímica utilizando un microscopio acoplado a una cámara fotográfica. Se eligieron aproximadamente 5 fotografías de cortes de la zona de los correspondientes núcleos hipotalámicos de cada cerebro y se analizaron manualmente utilizando el programa *ImageJ* (NIH).

### **II.2.13 Estudio de la integridad de la BHE**

Doce horas después del estímulo con LPS (20 mg/kg) o VEH, se les administró una dosis de 4 ml/kg de Azul de Evans (Biopack) al 2% en solución fisiológica por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. Una hora y media después de la inyección del colorante los animales se perfundieron (como se explicó anteriormente en la sección I.2.6.1 del Capítulo 1), y se extrajeron los cerebros; los cuales se post-fijaron y deshidrataron. Se congelaron a -80°C para su posterior utilización.

A continuación se realizaron cortes coronales de 30 µm utilizando un crióstato por congelación. Los cortes obtenidos se analizaron bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus BX41), se excitaron con el láser de 530nm y se tomaron fotografías de fluorescencia.

Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ, tomando los valores correspondientes a la media de intensidad de rojo en cada imagen (Rakos 2007; Liu 2015).

### **II.2.14 Análisis de poblaciones celulares en exudado peritoneal y bazo por Citometría de Flujo**

#### **II.2.14.1 Recolección de exudado peritoneal**

Se empapó la piel del ratón con etanol 70%, se levantó delicadamente con pinza y, se realizó un pequeño corte de unos 5 mm, mediante el cual se despegó y cortó la piel hasta exponer completamente la membrana peritoneal. Se inyectaron 3 ml de medio DMEM frío sobre la línea media de la cavidad peritoneal (separando dicha membrana de los órganos de modo de no pincharlos) y se lo

hizo circular por agitación (golpeando suavemente en ambos flancos del animal). Se aspiró el fluido peritoneal, insertando la aguja en el flanco izquierdo del ratón, y se transfirió a un tubo estéril que se colocó inmediatamente en hielo.

#### **II.2.14.2 Extracción de esplenocitos**

Posteriormente se extrajo el bazo y se lo colocó en medio de cultivo DMEM en hielo. Se disgregó por ruptura mecánica con tijera y se incubó con Colagenasa IV 1 mg/ml (Gibco) durante 20 minutos a 37 °C en agitación. Luego, se colocaron los tubos en frío y se inactivó la colagenasa con 15% SFB. Se volvió a disgregar el tejido utilizando puntas de micropipeta y se pasó la suspensión por un filtro de 70 µl. Una vez obtenidas las células en suspensión, se agregaron 9 partes de solución de lisis de glóbulos rojos ACK (150 mM NH<sub>4</sub>Cl – 10 mM KHCO<sub>3</sub> – 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) y se incubó 7 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células y se repitió el proceso con la solución ACK, se centrifugó, descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 300 µl de PBS con 3% de SFB.

#### **II.2.14.3 Inmunomarcación de las células y citometría de flujo.**

Se contó el número de células obtenidas de exudado peritoneal y bazo utilizando una Cámara de Neubauer. A continuación se realizaron alícuotas de 1x10<sup>6</sup> células, que se incubaron durante 40 min a temperatura ambiente con los anticuerpos de superficie correspondiente: anti-F4/80-PerCP (Biolegend, catálogo 123127), anti-CD11b-PE (Biolegend, catálogo 557396), anti-CD86-APC (Biolegend, catálogo 105011), y anti-CD206-PE (Biolegend catálogo 141705) o los controles de isotipo correspondientes. A continuación se agregó PBS-3%

SFB y centrifugó a 2000 rpm a 4°C durante 7 minutos. Se descartó el sobrenadante y se las fijó con PBS-Paraformaldehído 1% para su posterior análisis en el citómetro de flujo. Las muestras se mantuvieron a 4°C protegidas de la luz hasta el momento de lectura.

La lectura se realizó utilizando el Citómetro de Flujo BD FACSCalibur™ (Becton, Dickinson and Company). Se registraron los parámetros correspondientes al tamaño (*Forward Scatter*, FSC) y complejidad de membrana (*Side Scatter*, SSC), como así también las intensidades de fluorescencia de los fluoróforos conjugados a cada anticuerpo utilizado. Los datos fueron analizados con el programa FlowJo versión 7.6. Se evaluó el porcentaje de células en las regiones estudiadas y la intensidad media de fluorescencia (IMF) correspondiente a los anticuerpos de interés.

### **II.2.15 Estadística**

Se emplearon las mismas pruebas estadísticas que se detallan en la sección I.2.7 del Capítulo 1.

## **II.3 RESULTADOS**



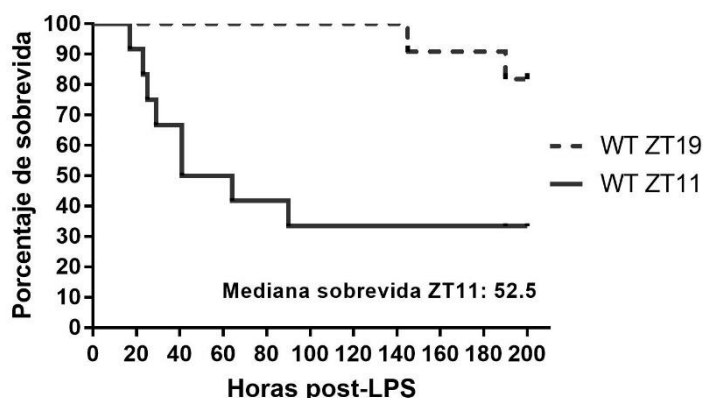


### II.3.1 Respuesta diferencial al shock endotóxico inducido a distintos horarios

#### II.3.1.1 Diferencia diaria en la tasa de mortalidad

Como se mencionó previamente, la tasa de mortalidad causada por altas dosis de LPS en ratones es mayor cuando la endotoxina es administrada al final del día (ZT11) en comparación a cuando se administra a mitad de la noche (ZT19; ver sección II.1.4; (Halberg 1960)).

Por lo tanto, en un principio se decidió corroborar que dicha diferencia se observara en nuestro modelo de shock séptico causado por la inoculación de 20 mg/kg de LPS en ratones a ZT11 o ZT19. Como se observa en la Figura II.3.1, la mortalidad causada por la inyección ip de LPS a ZT11 (77,66%) es significativamente mayor que a ZT19 (18,18%;  $p=0.0085$ ), demostrando que nuestro modelo es adecuado para estudiar con mayor profundidad las diferencias diarias observadas. Además, la mediana de sobrevida (tiempo que tardan en morir el 50% de los animales) para el grupo inoculado a ZT11 es de 52.5hs.



**Figura II.3.1. Curvas de sobrevida de animales tratados con LPS a ZT11 o ZT19.** Los ratones fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) a ZT11 (línea continua) o ZT19 (línea punteada), y monitoreados durante 3 días para estudiar el porcentaje de sobrevida. Log-rank (Mantel Cox) test:  $p=0.0085$  ( $n=12$  por grupo). Se informa la mediana de sobrevida para el grupo que posee un porcentaje de mortalidad mayor al 50%.

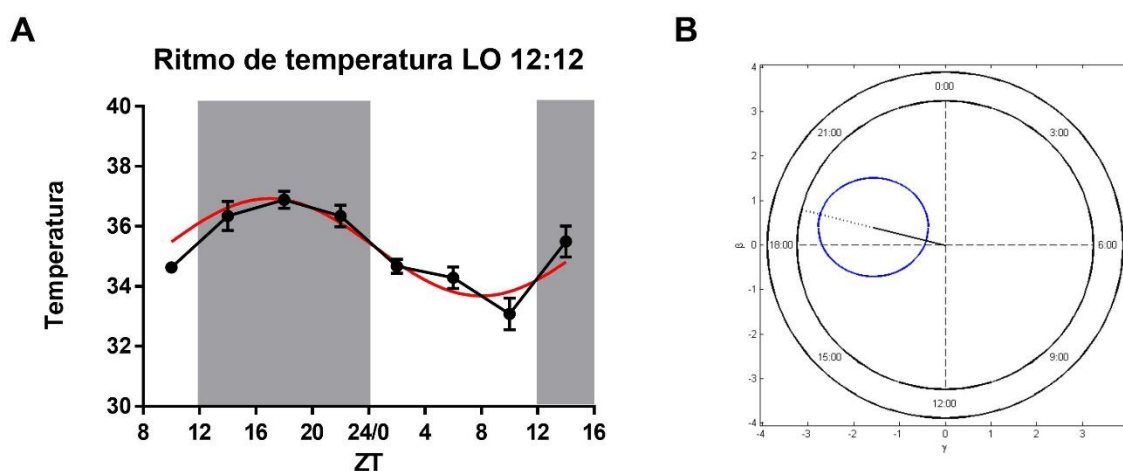
### II.3.1.2 Respuesta térmica diferencial inducida por LPS

Una de las características del shock séptico es la inducción de una profunda hipotermia en los pacientes, lo cual se correlaciona con un peor pronóstico (Remick & Xioa 2006; Stewart 2010). Esta hipotermia también se observa en modelos animales (Fonseca 2016). Por lo tanto, se decidió analizar si existe una respuesta termoregulatoria diferencial al inyectar dosis altas de LPS a diferentes horarios. Para esto se utilizó una cámara térmica (*FlirOne®*), capaz de acoplarse a un *SmartPhone*. Debe destacarse que esta metodología no invasiva resulta un hallazgo original de este trabajo de tesis.

Por lo tanto, previamente, dado que este dispositivo no se encontraba validado para este tipo de estudios, se realizó un análisis del ritmo de temperatura corporal en estos animales. Ya ha sido reportado, hace muchos años, que en condiciones de LO existe un ritmo en la temperatura corporal de mamíferos, y que en especies nocturnas este ritmo posee su máximo durante la noche (fase de actividad; (Benstaali 2001)). En los roedores utilizados para nuestro estudio, observamos también este ritmo en la temperatura corporal, con un máximo nocturno, como se observa en la Figura II.3.2 A (ANOVA  $p < 0.0001$ ).

Asimismo realizamos un análisis de cosinor, que resultó significativo ( $p = 0.003$ ; Figura II.3.2 B). Este análisis se realiza a fin de verificar que los datos se ajusten a una función coseno con un período de 24 horas, y se utiliza para obtener los parámetros de amplitud, mesor y acrofase (máximo de la señal) de dicho ritmo. En este caso la acrofase del ritmo de temperatura es a ZT 18.94 (Intervalo de Confianza – IC = 15.99-22.06), el mesor es de 35.30°C, y la amplitud, 1.62°C (IC = 0.42-2.81). Utilizando estos parámetros se graficó el ajuste rojo que se observa en la Figura II.3.2 A. Gráficamente el cosinor se

representa mediante un diagrama circular, que representa las 24h del día (Figura II.3.2 B), donde se puede ver la acrofase de la función cosenoidal y la amplitud del ajuste, que es la amplitud del vector resultante. De esta manera los intervalos de confianza de la amplitud y la acrofase forman una elipse alrededor del final del vector. Cuando el ajuste cosenoidal es significativo, esta elipse no incluye el punto medio del gráfico.

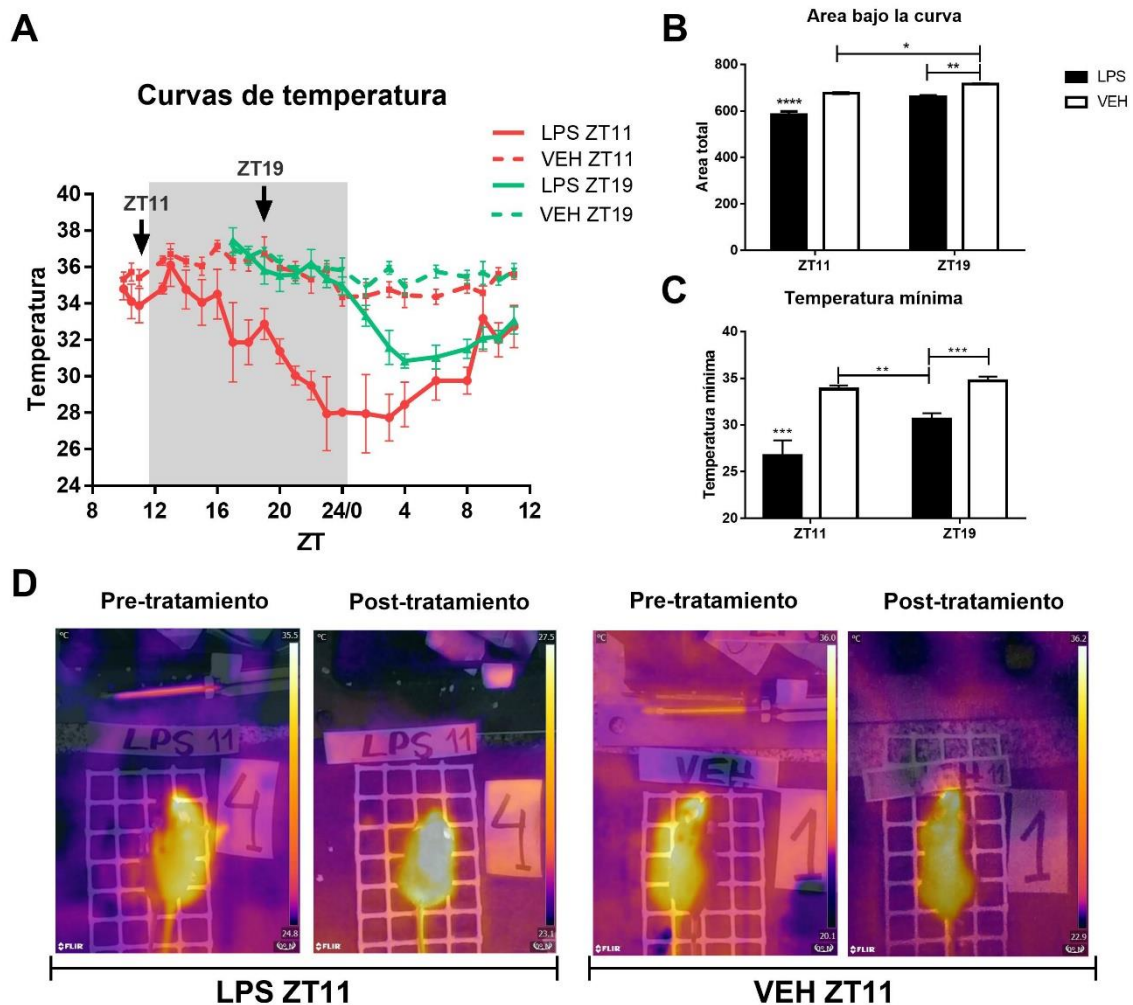


**Figura II.3.2. Ritmo de temperatura corporal en ratones en condiciones de LO 12:12.** Se tomaron fotografías de cada animal cada 4hs durante 28hs, utilizando la cámara térmica *FlirOne*®. A) Ritmo de temperatura, B) Test de Cosinor ( $p=0.003$ , Mesor= $35.30^{\circ}\text{C}$ , Acrofase= $18.94\text{h}$  - IC= $22.06\text{-}15.99\text{h}$ , Amplitud= $1.62^{\circ}\text{C}$  - IC= $0.42\text{-}2.81$ ). ANOVA de una vía:  $p<0.0001$ . El fondo gris señala las horas de oscuridad, mientras que el fondo blanco las horas de luz. La curva roja en A representa el ajuste cosenoidal. ( $n=5$  por punto horario).

Dado que los resultados obtenidos del ritmo de temperatura corporal fueron los esperados, se continuó con el estudio de la respuesta termoregulatoria en animales inoculados con dosis altas de LPS a ZT11 o ZT19. Para ello los ratones fueron inoculados con 20 mg/kg de LPS o VEH y se tomaron imágenes termográficas 1h antes del estímulo; y luego del mismo cada 1h durante 36h (solamente en este caso se utilizó este protocolo de toma de imágenes). En la Figura II.3.3 A, se muestran las curvas de temperatura corporal en función del

ZT, y se observa que aquellos animales que recibieron LPS a ZT11 desarrollaron una hipotermia más profunda comparada con aquellos que fueron inoculados a ZT19 ( $p < 0.0001$ , para todos los factores). Este resultado también puede observarse al graficar el área bajo la curva de temperatura, donde los animales estimulados a ZT11 presentan valores menores en comparación con aquellos inoculados a ZT19 (Figura II.3.3 B; Factor tratamiento y horario  $p < 0.001$ , factor interacción  $p = 0.0348$ ). El área bajo la curva fue calculada a partir de las curvas individuales, utilizando las 20h posteriores a la inoculación correspondiente. Adicionalmente, se analizó la temperatura mínima a la que llegó cada curva, y se observó que aquellos animales inoculados a ZT11 presentaron una temperatura mínima menor a la del resto de los grupos (Figura II.3.3 C; Factor tratamiento  $p < 0.0001$ , factor horario  $p = 0.0002$ , factor interacción  $p = 0.0067$ ). Tanto para ZT11 como para 19, los animales estimulados llegan a la temperatura mínima entre las 10 y 12h después del estímulo. La Figura II.3.3 D muestra imágenes térmicas representativas obtenidas con la cámara *FlirOne*®. A la derecha de cada imagen se observa la escala de colores correspondiente a las distintas temperaturas de cada punto de la fotografía.

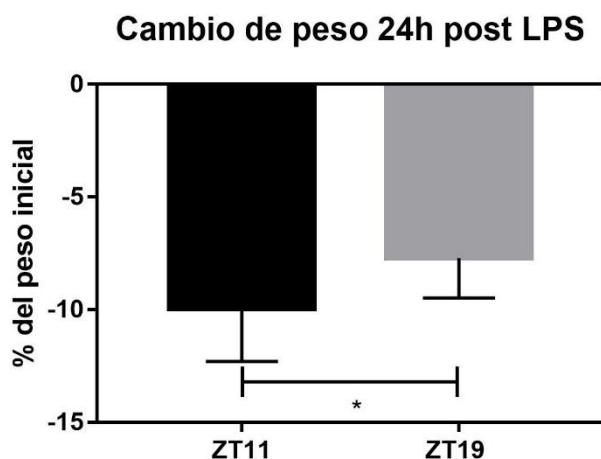
Entonces, las dosis altas de LPS administradas a ZT11 no solo inducen una mayor mortalidad, sino que también una mayor hipotermia en los animales estimulados.



**Figura II.3.3 Respuesta térmica de animales tratados con LPS o VEH a ZT11 o ZT19.** Los ratones fueron inyectados con LPS (20 mg/kg) o VEH a ZT 11 o ZT19 y se les tomaron fotografías termográficas durante 24h, cada 1h, utilizando la cámara térmica FlirOne® para analizar variaciones en la temperatura. A) Curvas de temperatura en función del tiempo (ZT), B) Media  $\pm$  EEM del área bajo la curva calculada desde en momento de la inoculación hasta las 20 h posteriores en cada una de las curvas individuales, C) Media  $\pm$  EEM temperatura mínima alcanzada por cada animal; D) Imágenes térmicas representativas. A) ANOVA de dos vías medidas repetidas (utilizando los datos a partir de ZT19): todos los factores  $p < 0.0001$ . ANOVA de dos vías: B) Factor tratamiento y horario  $p < 0.001$ , factor interacción  $p = 0.0348$ ; seguido por Test de Bonferroni: \*\*\*\* $p < 0.001$  LPS ZT11 vs todos los grupos, \*\* $p < 0.0020$  LPS ZT19 vs VEH ZT19, \* $p = 0.0215$  VEH ZT11 vs VEH ZT19; C) Factor tratamiento  $p < 0.0001$ , factor horario  $p = 0.0002$ , factor interacción  $p = 0.0067$ , seguido por Test de Bonferroni \*\*\*\* $p < 0.0001$  LPS ZT11 vs VEH ZT11/19, \*\*\* $p = 0.0004$  LPS ZT11 vs LPS ZT19, \*\*\* $p = 0.0003$  LPS ZT19 vs VEH ZT19, \*\* $p = 0.0023$  LPS ZT19 vs VEH ZT11 (n=4 por grupo).

### II.3.1.3 Disminución del peso corporal a causa del shock séptico

Además, de la alteración en la temperatura otra de las características del comportamiento de enfermedad desarrollado durante la sepsis es la pérdida del apetito o anorexia (Granger 2013). Existe una gran cantidad de evidencia que sugiere que las citoquinas inflamatorias inducidas por el LPS actúan a nivel central induciendo anorexia, y consecuente pérdida de peso (Socher 1988; Becskei 2008; Yue 2015). Por lo tanto, se decidió analizar si la pérdida de peso a causa del shock séptico era diferente de acuerdo al horario de administración del LPS. Para ellos se registró el peso inmediatamente antes y 24h después de la inoculación con LPS (20 mg/kg) a ambos horarios. Como se muestra en la Figura II.3.4, los animales inoculados con dosis altas de LPS a ZT11 tuvieron un mayor descenso en el peso corporal en comparación con aquellos inoculados a ZT19 ( $p=0.0248$ ).



**Figura II.3.4. Cambio del peso corporal en animales tratados con LPS a ZT11 o ZT19.** Se registró el peso corporal de ratones C57BL6/J WT antes y 24 horas después de la inyección ip con LPS (20 mg/kg) a ZT11 o ZT19. Se muestra el porcentaje de disminución del peso corporal en función del peso inicial. Test de t no pareado  $p=0.0248$ . ( $n=10$  por grupo).

En resumen, los resultados de esta sección muestran que la diferencia diaria en la mortalidad inducida por dosis altas de LPS se ve acompañada por una respuesta hipotérmica y una disminución de peso diferencial de acuerdo al

horario en el cual se inyecta el LPS; siendo ambos mayores en los animales estimulados a ZT11. Tanto la hipotermia como la anorexia son comportamientos modulados por el SNC, cuya respuesta al shock endotóxico se estudia a continuación.

### **II.3.2 Respuesta diferencial en el SNC a las dosis altas de LPS administradas a distintos horarios**

#### **II.3.2.1 Activación de los núcleos preóptico, paraventricular y supraquiasmático durante el shock endotóxico**

Como ya mencionamos, el núcleo o área preóptica (APO) hipotalámica es una de las principales regiones cerebrales implicadas en la termorregulación (Boulant 1998; Morrison 2016), aunque otras regiones hipotalámicas, como los NPV y los NSQ, también participan en esta respuesta (Lu 2001; Wanner 2013; Guzman-Ruiz 2015). Además, como se mostró tanto en el Capítulo I de esta tesis como en otros trabajos, los NPV y NSQ se activan en respuesta a estímulos inmunes (Belevych 2010; Paladino 2010). Dados estos indicios, y nuestro resultado que indica la inducción de una hipotermia diferencial, se decidió estudiar la activación neuronal en APO, NPV y NSQ a través del marcador de activación neuronal inmediatamente temprano cFos.

La administración de LPS a ZT11 indujo un incremento de la activación neuronal en APO (Figura II.3.5 A; ANOVA Factor interacción  $p=0.0077$ ) y en ambas regiones de los NSQ (Figura II.3.5 B y C; *Core*: ANOVA: Factor horario  $p=0.0178$ , factor tratamiento  $p=0.0046$ , *Shell*: ANOVA: Factor tratamiento  $p=0.0004$ ). Por el contrario, a ZT19 no se observa un incremento significativo en el número de células positivas. Adicionalmente, en NPV, la activación fue

significativamente mayor luego del tratamiento a ambos horarios, aunque a ZT11 este incremento es aún mayor que a ZT19 (Figura II.3.5 D; ANOVA: Factor tratamiento  $p < 0.0001$  Factor horario  $p = 0.0049$ ). En la Figura II.3.5 E, F y G, se muestran imágenes representativas de dichas inmunohistoquímicas.

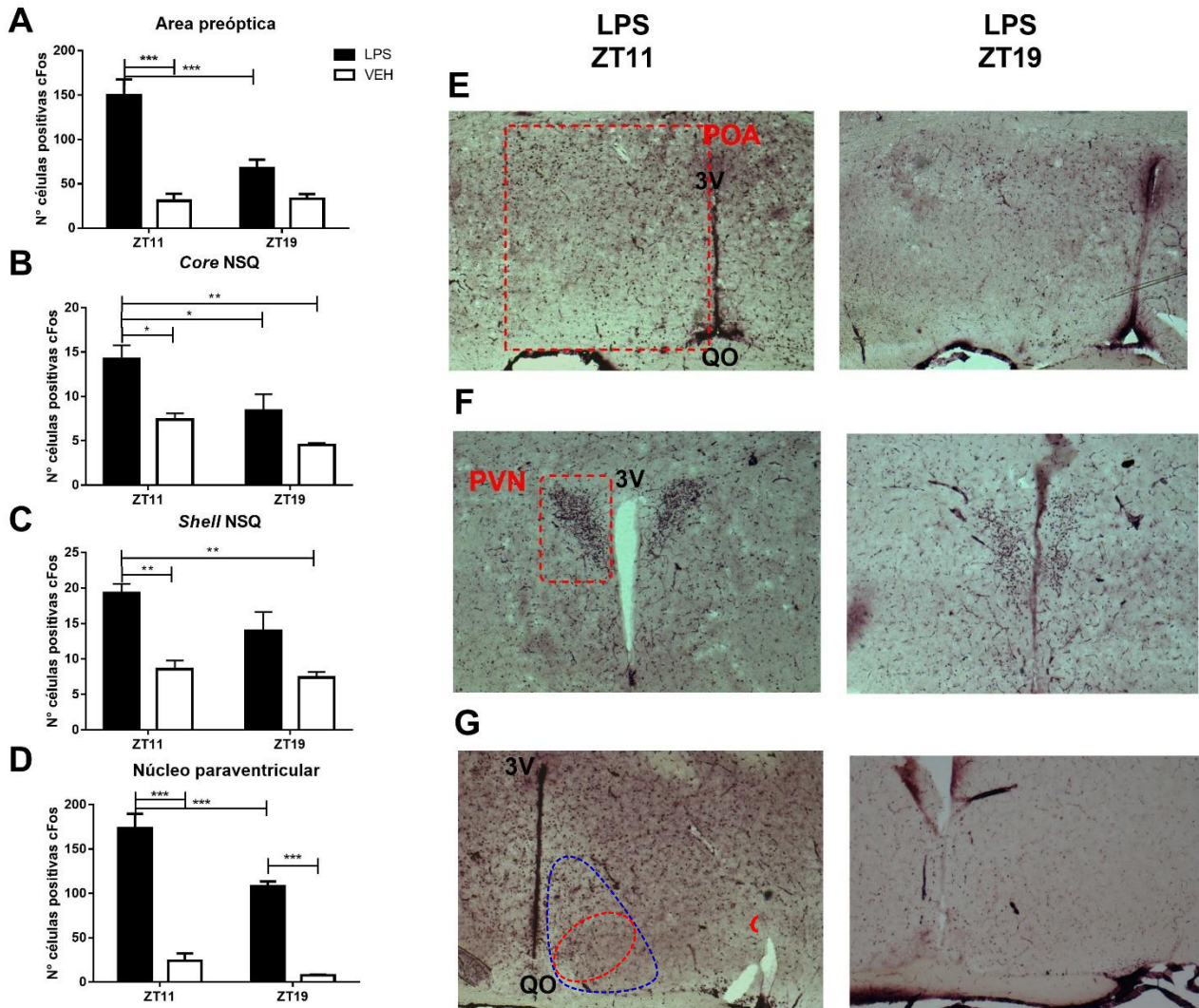


Figura II.3.5. Ver leyenda en la próxima página

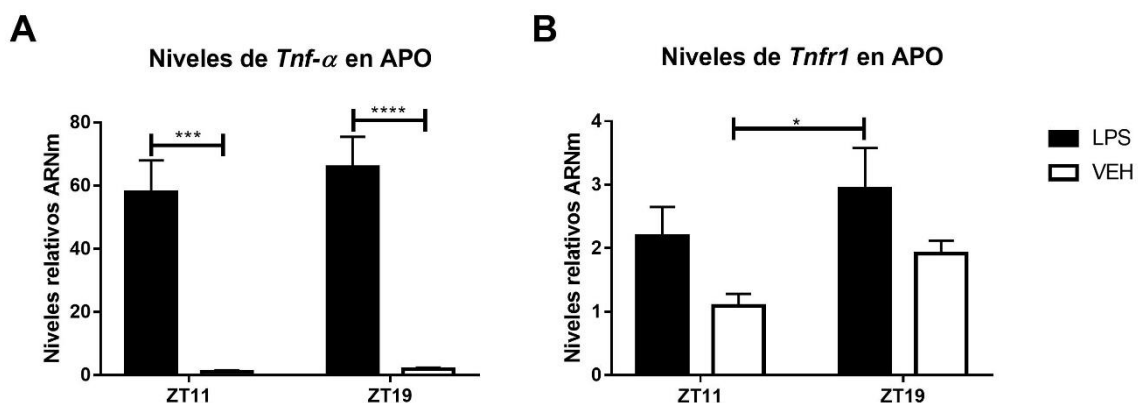


**Figura II.3.5. Expresión de cFos en el área preóptica, núcleo paraventricular y núcleo supraquiasmático del hipotálamo de ratones inoculados con LPS a ZT11 o ZT19.** Los ratones fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg), o VEH a ZT 11 o ZT19 y 2 horas después se tomaron las muestras. Media  $\pm$  EEM del número de células positivas para cFos en A) APO, B) *Core* y C) *Shell* de NSQ, y D) NPV. E-F-G) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica. Todas las regiones se encuentran delimitadas en las imágenes por las formas de línea punteada. 3V: tercer ventrículo. QO: quiasma óptico. ANOVA de dos vías: A) Factor tratamiento  $p < 0.0001$ , factor horario  $p = 0.0116$ , factor interacción  $p = 0.0077$ ; B) Factor horario  $p = 0.0178$ , factor tratamiento  $p = 0.0046$ ; C) Factor tratamiento  $p = 0.0004$  y D) Factor tratamiento  $p < 0.0001$ , factor horario  $p = 0.0049$ . En todos los casos seguido de Test de Bonferroni: A)  $p < 0.001$  LPS ZT11 vs VEH ZT11,  $p = 0.0003$  LPS ZT11 vs LPS ZT19,  $p = 0.0001$  LPS ZT11 vs VEH ZT19; B)  $p = 0.0280$  LPS ZT11 vs VEH ZT11,  $p = 0.0424$  LPS ZT11 vs LPS ZT19,  $p = 0.0066$  LPS ZT11 vs VEH ZT19; C)  $p = 0.0036$  LPS ZT11 vs VEH ZT11,  $p = 0.0078$  LPS ZT11 vs VEH ZT19; y D)  $p < 0.0001$  LPS ZT11 vs VEH ZT11,  $p = 0.0015$  LPS ZT11 vs LPS ZT19,  $p = 0.0002$  LPS ZT19 vs VEH ZT19. (n=10 para ambos grupos de LPS, n=7 para VEH ZT11 y n=4 para VEH ZT19).

### **II.3.2.2 Niveles de expresión de *Tnf- $\alpha$* y *Tnfr1* en APO en respuesta al shock endotóxico**

La activación neuronal observada por el incremento en la expresión de cFos, es una evidencia de que la señal de activación inmune periférica en respuesta a la inoculación de LPS, llega al hipotálamo cerebral. Entonces, se estudió si este estímulo inmune es capaz de inducir la expresión de ARNm de *Tnf- $\alpha$*  y su receptor *Tnfr1* en APO, dado que como ya dijimos es la principal región encargada de la termoregulación.

Observamos que la expresión de la citoquina se induce en respuesta al shock endotóxico, independientemente del horario en el que se administra el LPS (Figura II.3.6 A,  $p < 0.0001$ ); al igual que la expresión de *Tnfr1* (Figura II.3.6 A,  $p < 0.0143$ ). Esto indicaría que la diferencia en la activación neuronal hipotalámica no se debe a la expresión de estas moléculas en APO.



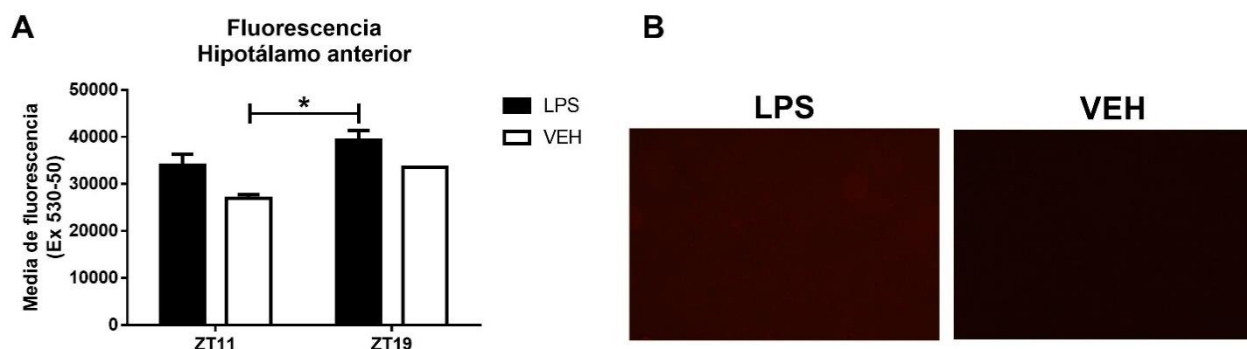
**Figura II.3.6. Niveles de ARNm de *Tnf-α* y *Tnfr1* en APO de animales inoculados con LPS o VEH a ZT11 o ZT19.** Los ratones fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg), o VEH a ZT11 o ZT19, y 2h después se recolectó el tejido de APO para su posterior análisis por PCR en Tiempo Real. Media  $\pm$  EEM de los niveles de ARNm de A) *Tnf-α* y B) *Tnfr1* en APO. ANOVA de dos vías: A) Factor tratamiento  $p < 0.0001$ , B) Factor tratamiento  $p = 0.0143$ ; seguido por Test de Bonferroni: A)  $p = 0.0001$  para LPS ZT11 vs VEH ZT11, y  $p < 0.0001$  para LPS ZT19 vs VEH ZT19; B)  $p = 0.0255$  para LPS ZT19 vs VEH ZT11.  $n = 6$  para todos los grupos, excepto LPS ZT19:  $n = 5$ .

### II.3.2.3 Integridad de la barrera hematoencefálica luego de la inducción del shock séptico

Como no observamos que *Tnf-α* ni su receptor (nuestros principales candidatos como mediadores de la comunicación entre el hipotálamo y la periferia) se expresaran diferencialmente en APO, hipotetizamos que quizás las citoquinas podrían atravesar la BHE e ingresar directamente al cerebro. Existe evidencia de que la administración de dosis altas de LPS puede provocar la ruptura de la BHE (Yeh 2015). Por lo tanto, se estudió si la administración de LPS en nuestro modelo provocaba la ruptura de la BHE, y si esto sucedía de manera diferencial de acuerdo al horario del estímulo. Entonces, la rotura de la BHE facilitaría la llegada de las moléculas inmunes al SNC.

Al estudiar los niveles de fluorescencia en el hipotálamo anterior, región donde se encuentra el APO, se observó que estos aumentaron con el tratamiento

con LPS a ambos horarios (Figura II.3.7;  $p=0.0374$ ). Esto indica que la BHE en estos animales se encuentra alterada, aunque no se observaron diferencias de acuerdo al horario del estímulo.



**Figura II.3.7. Integridad de la BHE en animales inoculados con LPS o VEH a ZT11 o ZT19.** Los ratones fueron inyectados ip con LPS (20mg/kg), o VEH a ZT11 o ZT19, 12 horas después se les inyectó azul de evans por vía intravenosa y 1 hora y media más tarde se los perfundió y extrajo el cerebro, para su posterior análisis. A) Media  $\pm$  EEM de los niveles de fluorescencia presentes en el tejido excitado a 530-50nm. B) Imágenes representativas de los cortes de hipotálamo anterior. Prueba de Kruskal Wallis  $p=0.0374$ , seguido de Test de Bonferroni:  $p<0.05$  para LPS ZT19 vs VEH ZT11 ( $n=4$  para ambos grupos LPS,  $n=3$  para VEH ZT11 y  $n=1$  para VEH ZT19).

De estos últimos experimentos entonces podemos remarcar que la administración de LPS a ZT11 induce la activación diferencial (en términos horarios) del APO, NSQ y NPV hipotalámicos, lo cual correlaciona con el horario en el que se induce mayor hipotermia. Sin embargo, esta activación diferencial no correlaciona con una expresión diferencial de Tnf- $\alpha$  o su receptor Tnfr1 en APO, ni con la ruptura diferencial de la BHE (en los tiempos estudiados); ya que ambas cosas suceden en respuesta al estímulo inmune en ambos horarios.

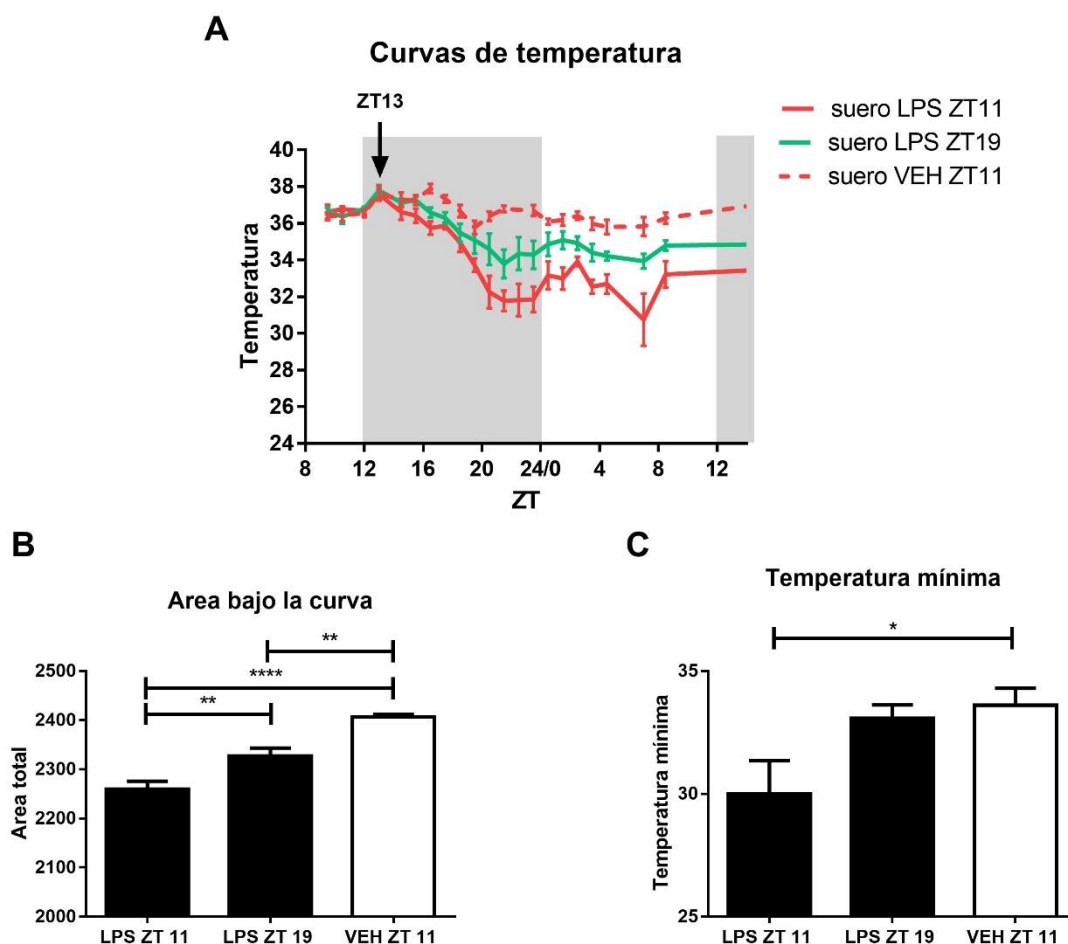
### **II.3.3 Diferencias en la composición sérica de animales inoculados a distintos horarios**

#### **II.3.3.1 Respuesta termoregulatoria luego de la inoculación con suero proveniente de animales tratados con LPS a ambos horarios**

Como se explica anteriormente, uno de los objetivos principales de este proyecto es caracterizar en mayor profundidad la respuesta horaria diferencial a las dosis altas de LPS y analizar si existe una molécula o grupo de moléculas responsables de desencadenar esta respuesta. Por lo tanto, se decidió analizar si el o los efectores se encuentran presentes en el suero de los animales con shock endotóxico. Para ello se inocularon animales con 20 mg/kg de LPS a ZT11 o ZT19, y dos horas después (ZT13 o ZT21, respectivamente) se les extrajo la sangre para la obtención del suero. A continuación dicho suero se inyectó por vía intraperitoneal en animales *naive* a ZT13. La elección de este horario (ZT13) se debió a que corresponde al horario en el cual se extrajo el suero de aquellos animales que se estimulan a ZT11, horario donde se observa el porcentaje más alto de mortalidad. Luego, se monitorearon los cambios en la temperatura corporal de los animales a los cuales se les administró el suero tomando fotografías con la cámara térmica FlirOne®.

Como se observa en las curvas de temperatura de la Figura II.3.8 A, aquellos animales que recibieron el suero proveniente de los ratones tratados con LPS a ZT11 desarrollaron una hipotermia mas profunda que aquellos que recibieron el suero de animales inoculados a ZT19 (ANOVA factor tratamiento  $p=0.0001$ ), lo cual se confirma al calcular el área bajo cada curva (Figura II.3.8 B;  $p<0.0001$ ). Nuevamente, los animales inoculados con el suero de ratones estimulados con LPS a ZT11 alcanzaron una temperatura mínima inferior a los

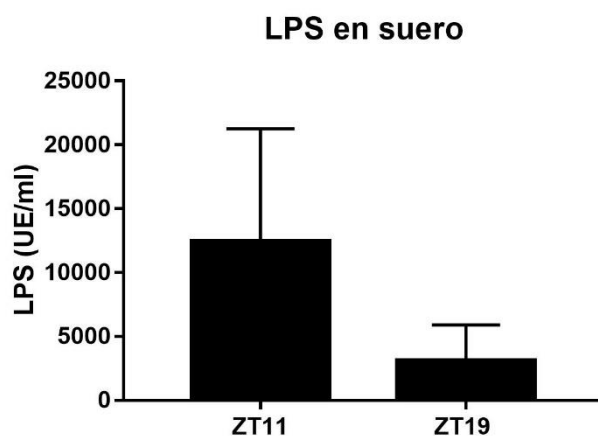
animales inoculados con el suero de animales estimulados a ZT19 (Figura II.3.8 C;  $p=0.0325$ ).



**Figura II.3.8. Curvas de temperatura de animales tratados a ZT13 con el suero de animales inyectados con LPS o VEH a ZT11 o LPS a ZT19.** Los ratones fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) a ZT11 o ZT19 o VEH a ZT11. Dos horas después se extrajo la sangre para obtener el suero, el cual se inyectó en otro grupo de animales a ZT13. Se tomaron imágenes térmicas durante 30 horas utilizando la cámara FlirOne®. A) Curvas de temperatura, B) Media  $\pm$  EEM del área bajo cada una de las curvas individuales, y C) Media  $\pm$  EEM de la temperatura mínima alcanzada por cada animal. A) ANOVA de dos vías medidas repetidas: factor tiempo e interacción  $p<0.0001$ , factor tratamiento  $p=0.0001$ . ANOVA de una vía: B)  $p<0.0001$  y, C)  $p=0.0325$ ; seguido por Test de Bonferroni: B)  $p<0.001$  para LPS ZT11 vs VEH ZT11,  $p=0.0086$  para LPS ZT11 vs LPS ZT19 y  $p=0.0023$  para LPS ZT19 vs VEH ZT11; C)  $p=0.0467$  para LPS ZT11 vs VEH ZT11 ( $n=6$  por grupo).

### II.3.3.2 Niveles de LPS en el suero de los animales estimulados

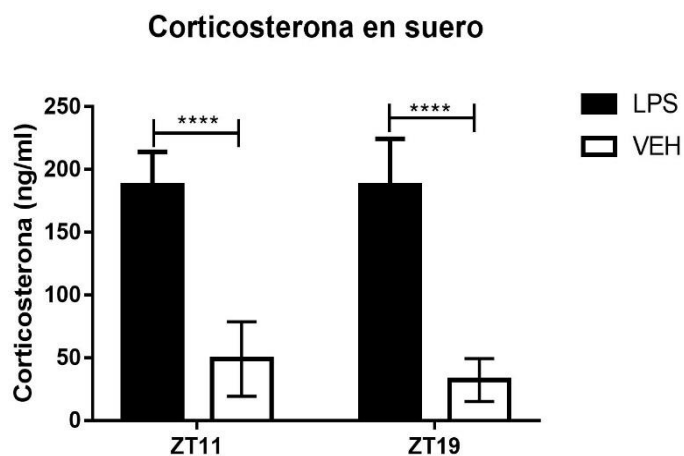
Luego de observar que el suero de los animales inoculados con dosis altas de LPS tuvo un efecto horario diferencial sobre la temperatura corporal de los animales *naive*, se decidió comenzar a caracterizar su composición. En un principio se midieron los niveles de LPS en suero, para conocer si esta molécula era capaz de llegar a la sangre luego de ser administrada por vía ip en la dosis utilizada (20 mg/kg). Para ello se utilizó un ensayo de lisado de cangrejo herradura del Atlántico (*Limulus polyphemus*), comúnmente utilizado para la detección de endotoxinas (Su & Ding 2015). Como se puede ver en la Figura II.3.9, se detectaron niveles de endotoxina en el suero extraído 2 horas después de la inyección con LPS por vía ip, tanto a ZT11 como a ZT19. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa según el horario de administración. En los animales inoculados con vehículo los niveles de endotoxina en suero resultaron indetectables.



**Figura II.3.9. Niveles de endotoxina en el suero de animales tratados con LPS a ZT11 o ZT19.** Ratones C57BL6/J WT fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) a ZT11 o ZT19, y 2h después se recolectó la sangre. Los niveles de endotoxina (Unidades de Endotoxina/ml) fueron medidos por un ensayo LAL. Test T de Student  $p > 0.05$  ( $n=3$  para ZT11 y  $n=5$  para ZT19).

### II.3.3.3 Niveles de corticosterona en suero de animales estimulados a ambos horarios

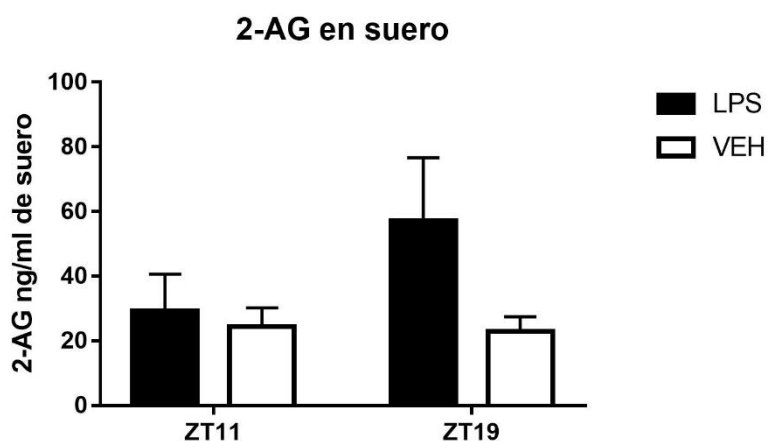
Continuando con el objetivo de caracterizar la composición del suero, se decidió estudiar los niveles de determinadas moléculas que se conoce que se inducen durante el shock séptico. Los glucocorticoides, entre ellos la corticosterona, son agentes con funciones inmunosupresoras, que se inducen ante distintos estímulos inflamatorios. Se ha reportado un incremento en sus niveles séricos tanto en pacientes como en modelos animales de shock séptico (Kwon 2007; Thompson & Van Eldik 2009). Por lo tanto, se midieron los niveles de corticosterona en el suero de animales inoculados con dosis altas de LPS tanto a ZT11 como a ZT19. Como se observa en la Figura II.3.10 los niveles de corticosterona en suero aumentaron luego del tratamiento con LPS, independientemente del horario (ANOVA Factor tratamiento  $p < 0.0001$ ).



**Figura II.3.10. Niveles de corticosterona en el suero de animales tratados con LPS o VEH a ZT11 o ZT19.** Ratones C57BL6/J fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) o VEH a ZT11 o ZT19, y 2hs después se realizó la extracción de sangre y se obtuvo el suero. Los niveles de corticosterona (ng/ml de suero) fueron medidos por RIA. ANOVA de dos vías: Factor tratamiento  $p < 0.0001$ , seguido de post-test de Bonferroni: \*\*\*\* $p < 0.0001$  (n=7 por grupo).

### II.3.3.4 Niveles del endocanabinoide 2-AG en suero de animales estimulados con LPS

Numerosos trabajos reportaron que los niveles de endocannabinoides fluctúan en respuesta a procesos inflamatorios, incluyendo la sepsis (Szafran 2015; Turcotte 2015). Además, se los ha relacionado con la hipotermia inducida por la administración de altas dosis de LPS (Schindler 2017). Los principales endocannabinoides endógenos son la Anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG). Por lo tanto, se decidió estudiar si en nuestro modelo había una variación en los niveles de estas moléculas en suero. Para ello se midieron los niveles tanto de 2-AG como de AEA en suero extraído dos horas después del estímulo con LPS o VEH a ZT11 o ZT19. En la Figura II.3.11 se puede observar que los niveles de 2-AG en suero no se modificaron significativamente luego del estímulo a ambos horarios. Por otra parte, los niveles de AEA no fueron detectables en las condiciones utilizadas.

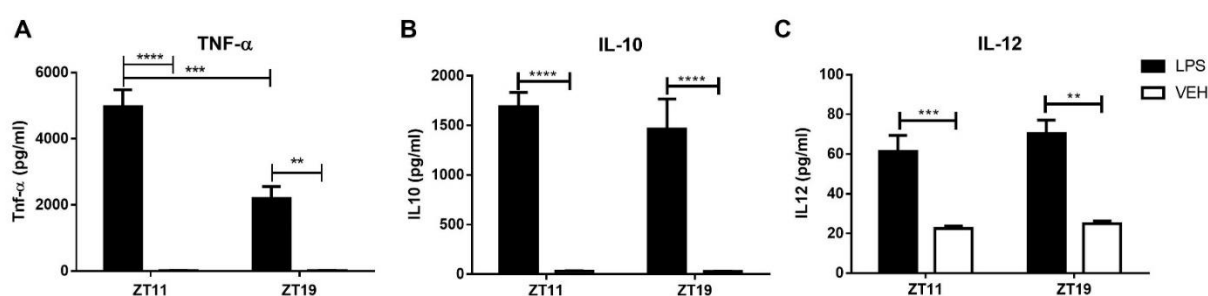


**Figura II.3.11. Niveles del endocanabinoide 2-AG en el suero de animales tratados con LPS o VEH a ZT11 o ZT19.** Ratones C57BL6/J WT fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) o VEH a ZT11 o ZT19, y 2hs después se realizó la extracción de sangre. Los niveles de 2-AG (en suero) fueron medidos por HPLC-MS/MS. ANOVA de dos vías: todos los factores ns (n=4 por grupo).



### II.3.3.5 Niveles de citoquinas en suero de animales tratados a ambos horarios

Como ya se mencionó en la introducción de este capítulo, una de las características principales del shock séptico es el desarrollo de una respuesta inflamatoria exacerbada caracterizada, entre otras cosas, por un aumento de los niveles de citoquinas y otras moléculas inmunes (Cinel & Opal 2009). Por esta razón, también se analizaron los niveles en suero de algunas de las principales citoquinas, 2 horas después de la inoculación con LPS o VEH. Como se observa en la Figura II.3.12, tanto las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-12, como la anti-inflamatoria IL-10, se inducen significativamente luego del tratamiento con dosis altas de LPS (A:  $p=0.0012$ ; B-C:  $p<0.0001$ ). Sin embargo, solamente TNF- $\alpha$  se induce en mayores niveles en aquellos ratones tratados con LPS a ZT11 en comparación con aquellos tratados a ZT19. La citoquina IFN- $\gamma$  no fue detectable en ninguno de los casos.



**Figura II.3.12. Niveles de citoquinas en el suero de animales tratados con LPS o VEH a ZT11 o ZT19.** Ratones C57BL6/J fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) o VEH a ZT11 o ZT19, y 2hs después se realizó la extracción de sangre. A continuación, se midieron los niveles de las citoquinas TNF- $\alpha$  (A), IL-10 (B) e IL-12 (C) en el suero de estos animales utilizando el Kit CBA para Citometría de Flujo. ANOVA de dos vías: A) Factor tratamiento  $p<0.0001$ , factor horario  $p=0.0011$ , factor interacción  $p=0.0012$ ; B) y C) Factor tratamiento  $p<0.0001$ . En todos los casos seguido de Test de Bonferroni: A)  $p<0.001$  para LPS ZT11 vs VEH ZT11,  $p=0.0005$  para LPS ZT11 vs LPS ZT19,  $p=0.0059$  para LPS ZT19 vs VEH ZT19; B)  $p<0.0001$  para LPS vs VEH a ambos horarios; y C)  $p=0.0008$  para LPS ZT11 vs VEH ZT11,  $p=0.0011$  para LPS ZT19 vs VEH ZT19 (n=5 para LPS/VEH ZT11, n=3 para LPS ZT19 y n=4 para VEH ZT19).

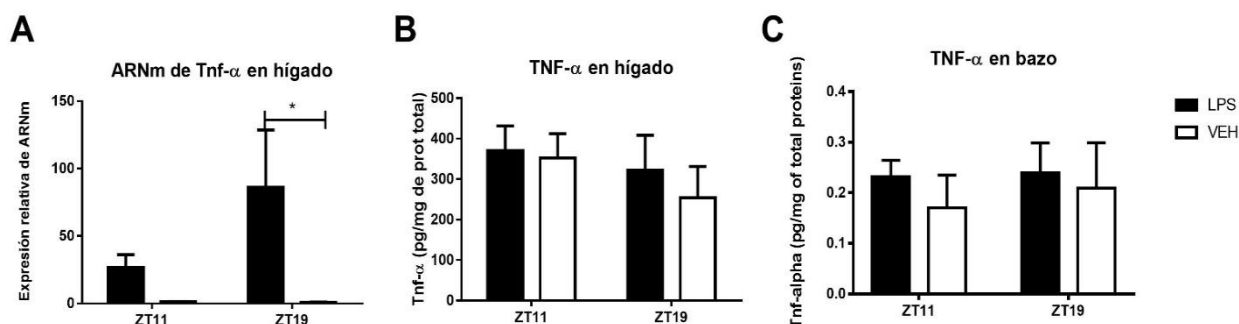
En conclusión, pudimos observar que el suero de animales inoculados con dosis altas de LPS es capaz de inducir una respuesta hipotérmica diferencial sobre animales *naïve*, al igual que el LPS (aunque de menor magnitud). De las variables estudiadas en el suero de estos animales, solo los niveles de TNF- $\alpha$  mostraron un incremento mayor a ZT11 que a ZT19, mientras los niveles séricos de corticosterona y de las citoquinas IL-10 (anti-inflamatoria) e IL-12 en suero aumentan luego del estímulo a ambos horarios. Este aumento diferencial de los niveles de TNF- $\alpha$  en suero, podría estar relacionado con la activación observada en APO y NSQ. Adicionalmente, la endotoxina administrada por vía ip puede llegar a circulación independientemente del horario en el que se inocula.

#### **II.3.4 Respuesta inflamatoria en tejidos periféricos y células peritoneales**

##### **II.3.4.1 Niveles de TNF- $\alpha$ en tejido hepático y esplénico**

El bazo es un órgano inmune periférico que actúa como el principal filtro de los patógenos y antígenos que pueden estar presentes en sangre (Bronte & Pittet 2013). Por su parte, el hígado contiene un gran número de células fagocíticas y participa en muchas funciones de la inmunidad innata, como la respuesta de fase aguda en la cual interviene, entre otras citoquinas, el TNF- $\alpha$  (Parker & Picut 2005; Kubes 2016). Con el objetivo de conocer si el TNF- $\alpha$  medido en suero proviene de algún tejido particular relacionado con el sistema inmune, se midieron los niveles de ARNm de Tnf- $\alpha$  en hígado y de proteína de TNF- $\alpha$  en hígado y bazo. Como se muestra en la Figura II.3.13, los niveles de ARNm de esta citoquina son mayores en el tejido hepático de ratones inoculados a ZT19 comparados con aquellos inoculados a ZT11 (Figura II.3.13 A,  $p=0.0129$ );

mientras que los niveles de proteína tanto en hígado como en bazo no se vieron alterados (Figura II.3.13 B y C).



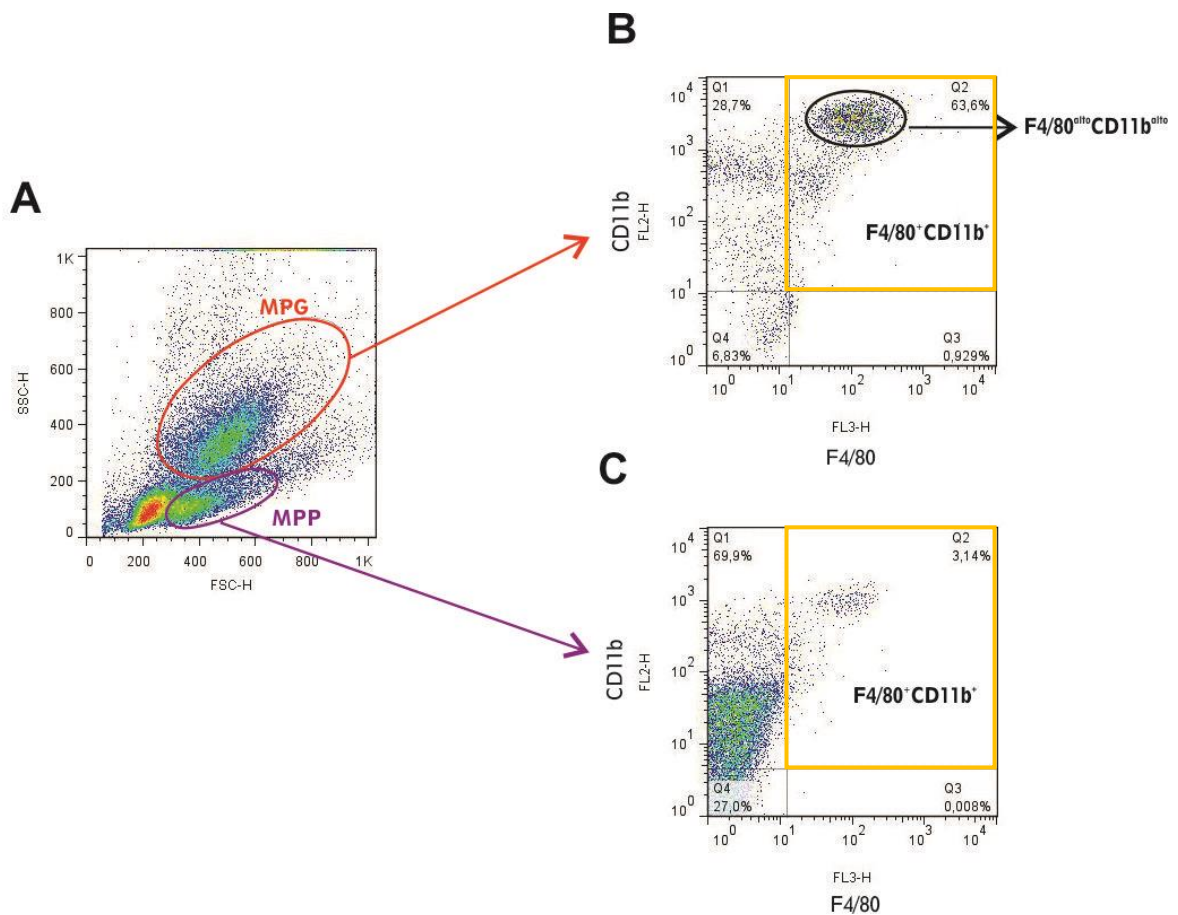
**Figura II.3.13. Niveles de ARNm y proteína de TNF-α en hígado y bazo luego del tratamiento con LPS o VEH a ZT11 o ZT19.** Los ratones fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) o VEH a ZT11 o ZT19. Dos horas después se extrajo el tejido para su procesamiento. Los niveles de ARNm fueron medidos por PCR en Tiempo Real, mientras que los de proteína por ELISA. A) Niveles de ARNm para Tnf-α en hígado. Niveles de proteína de la citoquina en tejido de hígado (B) y de bazo (C). A) ANOVA de dos vías: Factor tratamiento  $p=0.0129$ , seguido por post-test de Bonferroni:  $p<0.05$  LPS vs VEH ZT19 (mRNA en hígado:  $n=5$  para ZT11 y  $n=4$  para ZT19; proteína en hígado:  $n=5$  para LPS y  $n=4$  para VEH; Bazo:  $n=6$  por grupo).

#### II.3.4.2 Porcentaje y nivel de activación de macrófagos en exudado peritoneal luego del tratamiento con LPS a ambos horarios

Como se explica en la sección 2.3 los macrófagos son células pertenecientes al sistema inmune innato que residen en la mayoría de los tejidos del organismo. Son capaces de reconocer distintos patrones asociados a patógenos (PAMPs), y gracias a ello fagocitar los cuerpos extraños e iniciar y modular la respuesta inmune (Murray & Wynn 2011). Es por ello que se los considera un componente esencial de la respuesta inmune innata ante distintos procesos infecciosos, entre los cuales se puede encontrar la sepsis (Dahdah 2014; Cheng 2018). Como el LPS es inyectado por vía intraperitoneal es posible que exista una activación diferencial de estas células de acuerdo al horario. Por

esta razón se estudió el porcentaje y nivel de activación de macrófagos peritoneales luego de la estimulación con LPS o VEH a ZT11 y ZT19, utilizando la técnica Citometría de Flujo.

De esta forma, se han identificado dos poblaciones de macrófagos que residen en la cavidad peritoneal. Según sus características de tamaño (*Forward Scater*, FSC) y complejidad de membrana (*Side Scater*, SSC), se las identifica como: macrófagos peritoneales grandes (MPG), los cuales, presentan valores mayores en dichos parámetros; y macrófagos peritoneales pequeños (MPP), aquellos que muestran valores menores (Ghosn 2010). Por lo tanto, se analizaron ambas poblaciones de macrófagos dentro de la suspensión de células obtenida del lavado peritoneal de cada grupo de animales, 2 horas después del tratamiento. En la Figura II.2.14 A se muestra un dot plot de FSC (eje X) y SSC (eje Y) donde se observan las poblaciones celulares presentes en exudado peritoneal, identificadas como MPG y MPP. Dentro de cada una de estas poblaciones se identificaron los macrófagos a partir de los marcadores de superficie F4/80 y CD11b. Como se observa en las Figuras II.2.14 B y C, a partir de un dot plot donde se grafica F4/80 vs CD11b, se analizó el porcentaje de células doble positivas, F4/80<sup>+</sup>-CD11b<sup>+</sup>. Por último, dentro de esta población doble positiva se estudió la expresión de la proteína de transmembrana CD86, la cual es una molécula co-estimuladora (necesaria para la activación de los linfocitos), que se utiliza como marcador de activación celular.

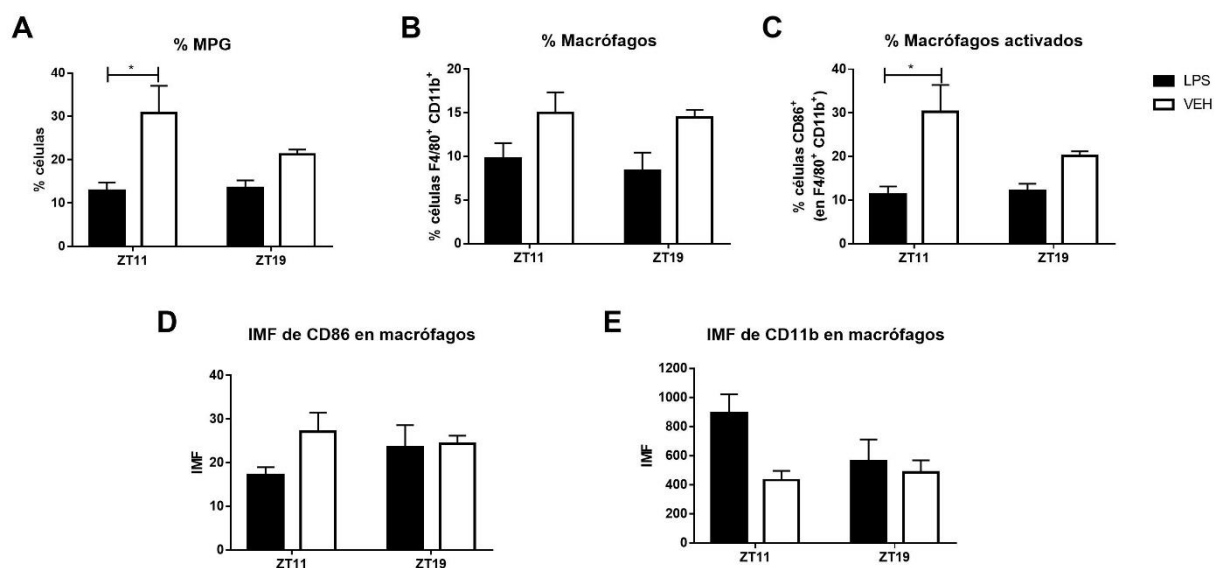


**Figura II.3.14. Poblaciones celulares presentes en exudado peritoneal, luego de la inoculación con LPS a ZT11 o ZT19.** Los animales fueron inyectados ip con LPS (20mg/kg) o VEH a ZT11 o ZT19 y dos horas más tarde se recolectó el exudado peritoneal. Dot plot A) del tamaño (FSC) y granularidad (SSC) de las células presentes en exudado peritoneal, y de F4/80 vs CD11b de las células de la población B) MPG y C) MPP. En B también se muestra la población de células identificadas como F4/80<sup>alt+</sup>CD11b<sup>alt+</sup>. La población celular delimitada por la línea roja (en A) corresponde a los MPG, mientras que la delimitada por la línea violeta a la MPP. La división de los cuadrantes en B y C se colocaron de acuerdo a los correspondientes controles de isotipo. El cuadrado amarillo señala el cuadrante correspondiente a las células F4/80<sup>+</sup>-CD11b<sup>+</sup>.

En la Figura II.3.15 se muestra el análisis de las células presentes en la población de MPG. En primer lugar, se puede observar que el porcentaje de células presentes en esta población disminuye luego del estímulo con LPS a ZT11 (Figura II.3.15 A;  $p=0.019$ ). A su vez, se observa una disminución del porcentaje de MPG F4/80<sup>+</sup>-CD11b<sup>+</sup> (macrófagos propiamente dichos) luego del tratamiento con LPS (Figura II.3.15 B; ANOVA Factor tratamiento  $p=0.0151$ ).

Adicionalmente, se estudió el nivel de activación de las células F4/80<sup>+</sup>-CD11b<sup>+</sup> a través del marcador de superficie CD86, y se observó que el porcentaje de macrófagos activados (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>) también disminuían al estimular con LPS (Figura II.3.15 C; ANOVA: Factor tratamiento  $p=0.0038$ ). Asimismo, se registró la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las moléculas analizadas, la cual se condice con la cantidad de la molécula de interés presente en la membrana plasmática. En cuanto a la IMF del marcador CD86 de los MPG F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, no se observaron diferencias (Figura II.3.15 D), mientras que sí se observó un aumento de la IMF del marcador de CD11b en dicha población (Figura II.3.15 E; ANOVA: Factor tratamiento  $p=0.0441$ ). Esto indicaría que en cuanto a los MPG, si bien hay menos cantidad, los presentes estarían expresando más CD11b en membrana, molécula relacionada con la adhesión y extravasación de los leucocitos (Murphy 2017).

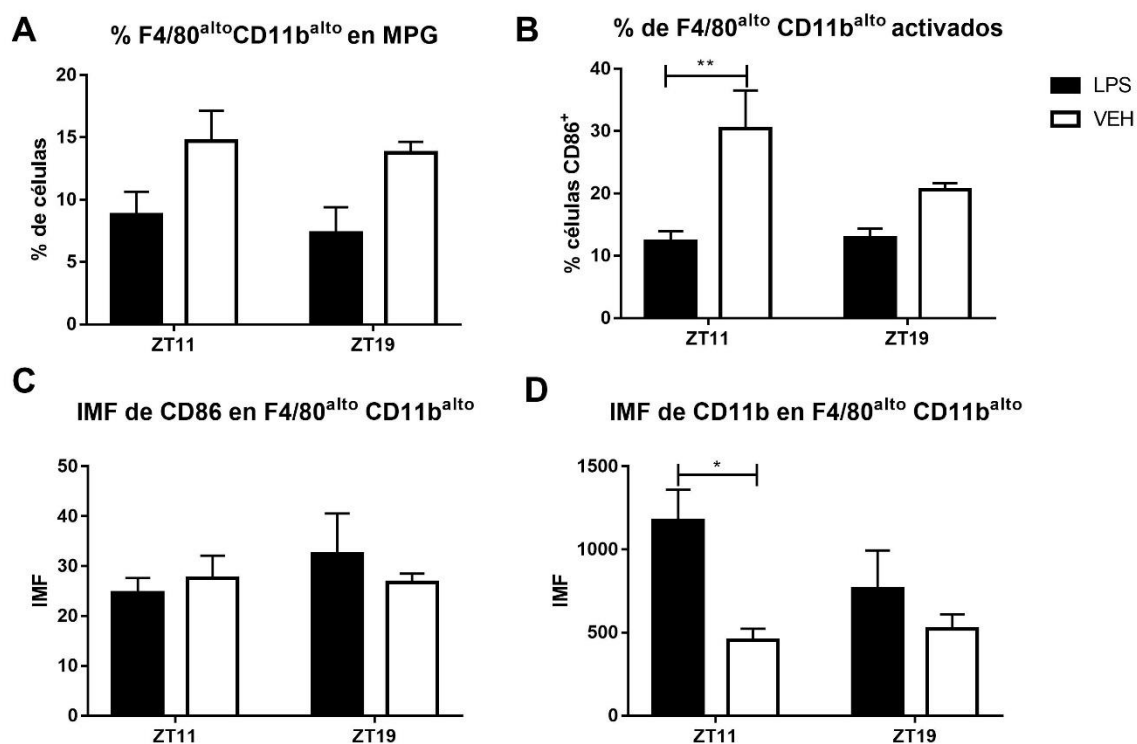
Cabe destacar en relación a la diferencia en el horario de inoculación del LPS, que la disminución en el porcentaje de células en la población MPG así como los macrófagos activados (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>) se observa solo en los animales inoculados a ZT11 ( $p<0.05$  y  $p=0.0119$ , respectivamente).



**Figura II.3.15. Porcentajes y nivel de activación de las células peritoneales correspondientes a la población MPG, luego de la inoculación con LPS a ZT11 o ZT19.** Los animales fueron inyectados ip con LPS (20mg/kg) o VEH a ZT11 o ZT19. Dos horas más tarde se recolectó el exudado peritoneal para realizar la marcación correspondiente. Media  $\pm$  EEM de A) porcentaje de células presentes en la región correspondiente a MPG, B) porcentaje de MPG F4/80<sup>+</sup>-CD11b<sup>+</sup> respecto de las células totales analizadas, C) porcentaje de células CD86, D) IMF del marcador CD86, y E) IMF del marcador CD11b de las células F4/80<sup>+</sup>-CD11b<sup>+</sup> de la región de MPG. A) Prueba de Kruskal Wallis: p=0.019, seguido por post-test de Dunn's \*p<0.05 para LPS ZT11/LPS ZT19 vs VEH ZT11. ANOVA de dos vías: Factor tratamiento B) p=0.0151, C) p=0.0038 y E) p=0.0441; seguido por post-test de Bonferroni: C) p=0.0119 para LPS ZT11 vs VEH ZT11 y p=0.0357 para VEH ZT11 vs LPS ZT19 (n=5 para LPS ZT11, n=3 para LPS ZT19, n=4 para VEH ZT11 y n=3 para VEH ZT19).

En el análisis de la población MPG, se detectó que había una subpoblación que expresaba niveles altos de los marcadores F4/80 y CD11b (F4/80<sup>alto</sup>-CD11b<sup>alto</sup>), por lo que se realizó un análisis por separado de ésta obteniéndose los mismos resultados que en la población F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. En otros trabajos también se considera los niveles de expresión de ambos marcadores, ya que muchas veces se corresponden con distintos tipos de macrófagos (Tomasdottir 2014; Cassado Ados 2015). Como se observa en la Figura II.3.16 A, el porcentaje de macrófagos disminuyó con el tratamiento con LPS (F4/80<sup>alto</sup>CD11b<sup>alto</sup>. ANOVA Factor tratamiento p=0.0121), al igual que el porcentaje de macrófagos activados (F4/80<sup>alto</sup>CD11b<sup>alto</sup>CD86<sup>+</sup>. Figura II.3.16 B;

p=0.01), mientras que la IMF para CD11b aumentó con el tratamiento en la población de macrófagos (Figura II.3.16 D; ANOVA Factor tratamiento p=0.0159).

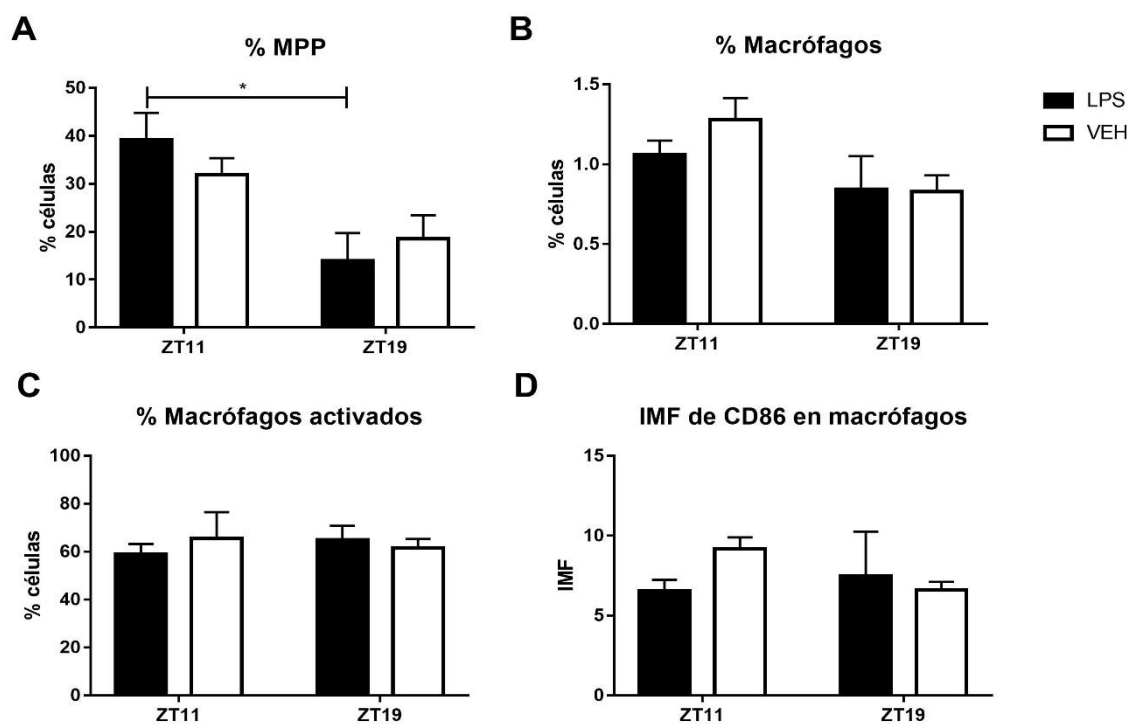


**Figura II.3.16. Porcentajes y nivel de activación de las células de alto nivel de expresión de F4/80 y CD11b presentes en la población MPG.** Los animales fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) o VEH a ZT11 o ZT19. Dos horas más tarde se recolectó el exudado peritoneal para realizar la marcación correspondiente. Media  $\pm$  EEM de A) porcentaje de células F4/80<sup>alto</sup> CD11b<sup>alto</sup> de la población MPG; B) porcentaje de células CD86 dentro de las F4/80<sup>alto</sup> CD11b<sup>alto</sup>; C) IMF para el marcador CD86 de las células F4/80<sup>alto</sup> CD11b<sup>alto</sup>; e D) IMF para el marcador CD11b de las células F4/80<sup>alto</sup>-CD11b<sup>alto</sup> de la región MPG. ANOVA de dos vías: Factor tratamiento A) p=0.0121 y D) p=0.0159; seguido por post-test de Bonferroni: D) \*p=0.0381 para LPS ZT11 vs VEH ZT11. B) Prueba de Kruskal Wallis: p=0.01, seguido por post-test de Dunn's p<0.05 para LPS ZT11 vs VEH ZT11/VEH ZT19. (n=5 para LPS ZT11, n=3 para LPS ZT19, n=4 para VEH ZT11 y n=3 para VEH ZT19).

Por último, se analizó la población MPP dentro de las células de exudado peritoneal. Como se muestra en la Figura II.3.17 A, el porcentaje de estas células no se modificó con el tratamiento, pero si se observó una variación diaria en sus



porcentajes basales (vehículo), mostrando mayores valores a ZT11 que a ZT19 (ANOVA factor tiempo  $p=0.0041$ ). Exactamente lo mismo se observó con el porcentaje de macrófagos presentes en la población MPP, identificados como  $F4/80^+ - CD11b^+$  (Figura II.3.17 B, ANOVA factor tiempo  $p=0.0280$ ). En cuanto al nivel de activación de estos macrófagos, no se observaron cambios en el porcentaje ni IMF del marcador CD86 en esta población (Figura II.3.17 C y D). Por lo tanto, podemos decir que si bien esta población celular muestra diferencias diarias no parece participar de la respuesta a LPS, al menos durante las 2 primeras horas luego de la inoculación.



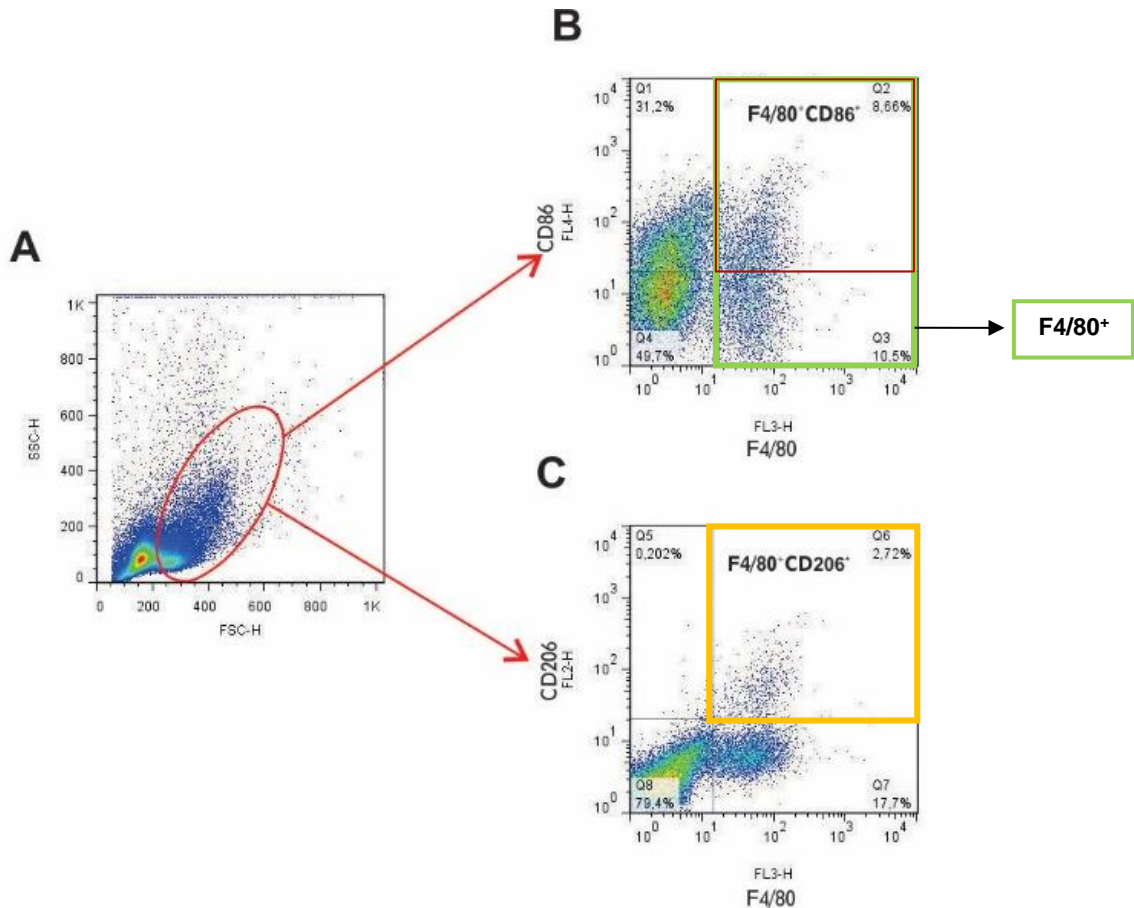
**Figura II.3.17. Porcentajes y nivel de activación de las células peritoneales presentes en la población MPP.** Los animales fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) o VEH a ZT11 o ZT19. Dos horas más tarde se recolectó el exudado peritoneal para realizar la marcación correspondiente. Media  $\pm$  EEM de A) porcentaje de células presentes dentro de la población MPP; B) porcentaje de células  $F4/80^+ - CD11b^+$ ; C) porcentaje de células  $CD86^+$  e D) IMF para CD86 de las células  $F4/80^+ - CD11b^+$  de la región MPP. ANOVA de dos vías: Factor tiempo A)  $p=0.0041$  y B)  $p=0.0280$ ; seguido por post-test de Bonferroni: A)  $*p=0.0346$  para LPS ZT11 vs LPS ZT19. ( $n=5$  para LPS ZT11,  $n=3$  para LPS ZT19,  $n=4$  para VEH ZT11 y  $n=3$  para VEH ZT19).

Por lo tanto, en exudado peritoneal observamos que en la población MPG, disminuye el porcentaje de células totales, y en particular de macrófagos activados en respuesta al LPS administrado a ZT11. Adicionalmente, la IMF para CD11b en macrófagos aumenta con el tratamiento con LPS principalmente a ZT11. En cuanto a la población MPP, no se observaron variaciones con respecto al tratamiento con LPS, pero sí se encontró una diferencia entre los niveles basales del porcentaje de células totales y de macrófagos, encontrándose incrementados durante el final del día.

#### **II.3.4.3 Niveles de macrófagos en bazo luego del tratamiento con LPS a ambos horarios**

Como se menciona previamente, los macrófagos del bazo poseen un importante rol en la inmunidad innata. Es por ello que se analizó el porcentaje y el nivel de activación de estas células en tejido esplénico. Para este estudio se utilizó la población celular de bazo que dadas sus características de mayor tamaño (FSC) y granularidad (complejidad de membrana, SSC) correspondía a células compatibles, entre otras, con macrófagos (Figura II.3.18 A). Luego, dentro de esa población se analizó el porcentaje de macrófagos totales y activados, a través de los marcadores F4/80 y CD86. A partir del dot plot de la Figura II.3.18 B, se obtienen los macrófagos totales, población F4/80<sup>+</sup>, realizando una región que incluye ambos cuadrantes de la derecha (recuadro verde); mientras que los macrófagos activados, F4/80<sup>+</sup>-CD86<sup>+</sup>, corresponden al cuadrante de arriba a la derecha (doble positivo; cuadrado rojo). Adicionalmente se analizaron los macrófagos tipo M2 (más adelante se detallan sus funciones), estudiando los niveles de F4/80 y CD206 (característico del subtipo M2), como

la población doble positiva F4/80<sup>+</sup>-CD206<sup>+</sup> de la figura II.3.18 C (cuadrante de arriba a la derecha, en amarillo). Sobre esta última población se evaluaron adicionalmente las células que expresan CD86 (F4/80<sup>+</sup>-CD206<sup>+</sup>-CD86<sup>+</sup>).



**Figura II.3.18. Poblaciones celulares presentes en tejido esplénico, luego de la inoculación con LPS a ZT11 o ZT19.** Los animales fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) o VEH a ZT11 o ZT19 y dos horas más tarde se recolectó el exudado peritoneal. Dot plot A) del tamaño (FSC) vs complejidad de membrana (SSC) de las células presentes en tejido esplénicos; y B) dot plot F4/80 vs CD86 y de C) F4/80 vs CD206 de las células de la población señalada en A. Las líneas que delimitan los cuadrantes en B y C se colocaron tomando en cuenta los controles de isotipo. El cuadrado verde delimita los F4/80<sup>+</sup>, el rojo los F4/80<sup>+</sup>-CD86<sup>+</sup> y el amarillo los F4/80<sup>+</sup>-CD206<sup>+</sup>.

Como se puede observar en la Figura II.3.19 A, el porcentaje de células en la región analizada no se modificó a causa del tratamiento ni del horario de estimulación. Sin embargo, se observó que el tratamiento con LPS a ZT11, pero no a ZT19, produjo un aumento en el porcentaje de macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) totales en esta región (Figura II.3.19 B;  $p < 0.05$ ); como así también en el porcentaje de macrófagos activados (F4/80<sup>+</sup> - CD86<sup>+</sup>) (Figura 2.3.19 C;  $p < 0.05$ ). En cuanto a la IMF del marcador CD86, no se observó un efecto del tratamiento.

Adicionalmente, en forma similar a los observado en los MPP presentes en exudado peritoneal, pudimos observar una diferencia en los niveles basales (VEH), en este caso la IMF de CD86, siendo más elevados a ZT11 que a ZT19 (Figura II.3.19 D; ANOVA factor tiempo  $p = 0.0034$ , factor interacción  $p = 0.0479$ ).

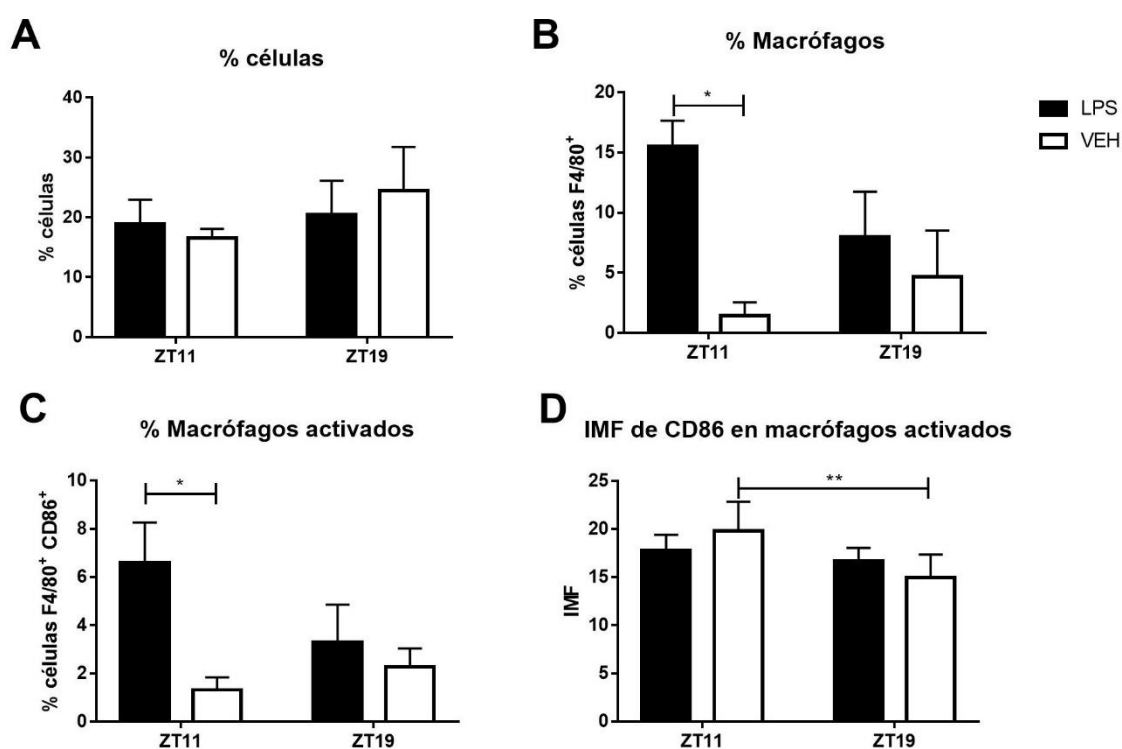
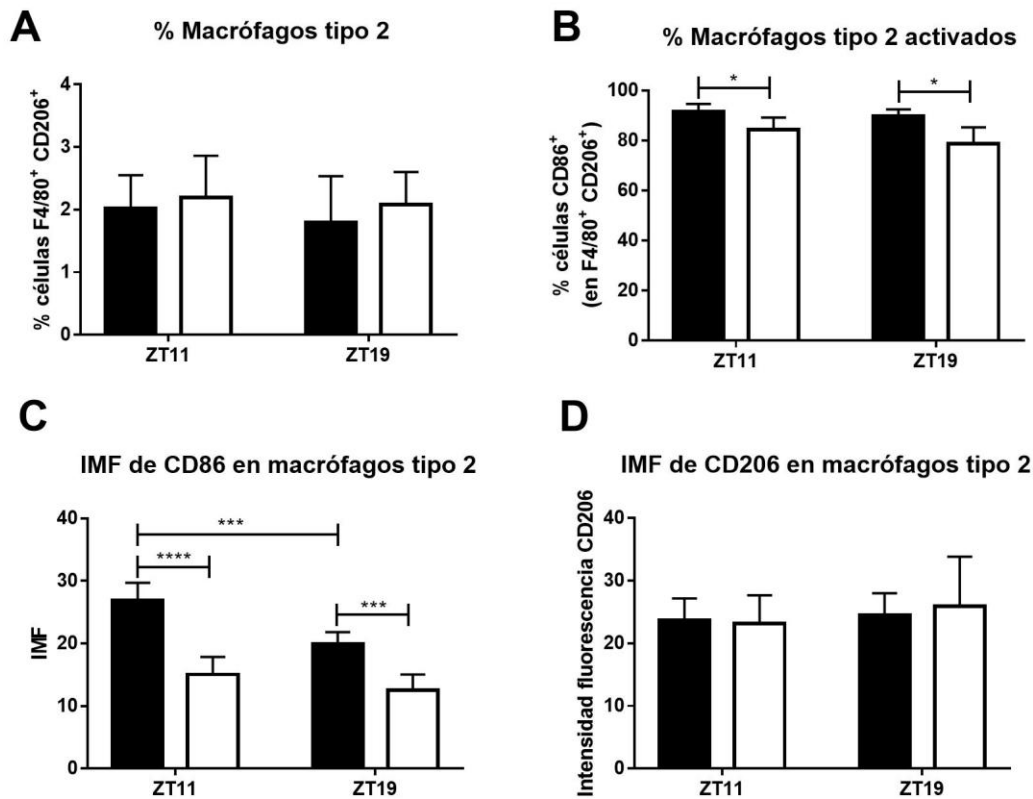


Figura II.3.19. Ver leyenda en la próxima página

**Figura II.3.19. Porcentajes y niveles de activación de las células extraídas de tejido esplénico.** Los animales fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) o VEH a ZT11 o ZT19. Dos horas más tarde se recolectó tejido esplénico, para su procesamiento y posterior marcado. Media  $\pm$  EEM de A) porcentaje de células presentes dentro de la región correspondiente; B) porcentaje de células F4/80<sup>+</sup> dentro de dicha región; C) porcentaje de células F4/80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> dentro la misma región, e D) IMF para el marcador CD86 de las células F4/80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> dentro de la region mencionada. Prueba de Kruskal Wallis: B) p=0.0003 y C) p=0.001. D) ANOVA de dos vías: Factor tiempo p=0.0034, factor interacción p=0.0479. Seguido por post-test de Dunn's: B y C) \*p<0.05 para LPS ZT11 vs VEH ZT11, o de Bonferroni: D) p=0.0061 para VEH ZT11 vs VEH ZT19. (n=6 por grupo).

A su vez, los macrófagos son células plásticas que de acuerdo a su localización y las señales que reciban se pueden polarizar en dos grandes poblaciones: los activados por la vía clásica o M1, y los activados por la vía alternativa o M2. Los macrófagos de tipo M1 se caracterizan, entre otras cosas, por la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la respuesta a patógenos; mientras que los de tipo M2 están asociados con funciones anti-inflamatorias y de homeostasis (Zhang & Wang 2014; Sica 2015). A continuación, se estudió el porcentaje y nivel de activación de los macrófagos de tipo M2 en bazo, identificados por el marcador de superficie CD206. Como se muestra en la Figura II.3.20 A, el porcentaje de macrófagos tipo M2 (F4/80<sup>+</sup>-CD206<sup>+</sup>) no se modificó con el tratamiento con LPS ni por el horario de extracción. En cambio, sí se observó una mayor activación de estos macrófagos debido al estímulo con LPS, evidenciado tanto por el porcentaje de macrófagos F4/80<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> (Figura II.3.20 B, p=0.0028), como así también por un aumento en la IMF de CD86 en estas células (Figura II.3.20 C, ANOVA factor tratamiento p<0.0001, factor tiempo p=0.0002, factor interacción p=0.0404). Adicionalmente, se observó que los niveles de intensidad de fluorescencia de CD86 aumentaron en mayor medida con el tratamiento con LPS a ZT11 en mayor medida que a ZT19

( $p=0.0007$ ). Por último, no se observaron modificaciones en los valores de IMF obtenidos para el marcador CD206.



**Figura II.3.20. Porcentajes y nivel de activación de macrófagos de tipo M2 en bazo.** Los animales fueron inyectados ip con LPS (20mg/kg) o VEH a ZT11 o ZT19. Dos horas más tarde se recolectó el tejido esplénico, para su procesamiento y posterior inmunomarcación. Media  $\pm$  EEM de A) porcentaje de células F4/80<sup>+</sup> - CD206<sup>+</sup>; B) porcentaje de células CD86<sup>+</sup> dentro de los F4/80<sup>+</sup>-CD206<sup>+</sup>; C) IMF para el marcador CD86 de las células F4/80<sup>+</sup>-CD206<sup>+</sup>, y D) IMF para el marcador CD206 de las células F4/80<sup>+</sup>-CD206<sup>+</sup>. Prueba de Kruskal Wallis: B)  $p=0.0028$  y C) ANOVA de dos vías: factor tratamiento  $p<0.0001$ , factor tiempo  $p=0.0002$ , factor interacción  $p=0.0404$ . Seguido por post-test de Dunn's: B)  $*p<0.05$  para LPS ZT11 vs VEH ZT11 y LPS ZT19 vs VEH ZT19, y de Bonferroni: C)  $p<0.0001$  para LPS ZT11 vs VEH ZT11/ VEH ZT19,  $p=0.0007$  para LPS ZT11 vs LPS ZT19,  $p=0.0219$  para VEH ZT11 vs LPS ZT19, y  $p=0.0004$  para LPS ZT19 vs VEH ZT19. (n=6 por grupo).

En resumen, en bazo observamos que se produjo un aumento de los macrófagos totales y activados en respuesta al LPS a ZT11. Adicionalmente, observamos un aumento en la activación de los macrófagos de tipo 2 luego de la administración del estímulo a ambos horarios, siendo sus niveles de activación (IMF para CD86) nuevamente más altos en respuesta al LPS a ZT11. En cuanto a los niveles basales (VEH), encontramos una diferencia en la IMF de CD86 en los macrófagos totales, siendo más altos a ZT11.

En conjunto, el análisis de las poblaciones de macrófagos en exudado peritoneal y bazo nos indican que existen diferencias diarias tanto en los porcentajes como en el nivel de activación de estas células en respuesta al LPS, siendo más pronunciadas a ZT11. La diferencia diaria basal encontrada en los MPP en peritoneo, así como el nivel de activación de los macrófagos en bazo, podría indicar que hacia el final del día puede existir un mayor nivel de moléculas, como citoquinas, secretadas por estos macrófagos en esta cavidad.

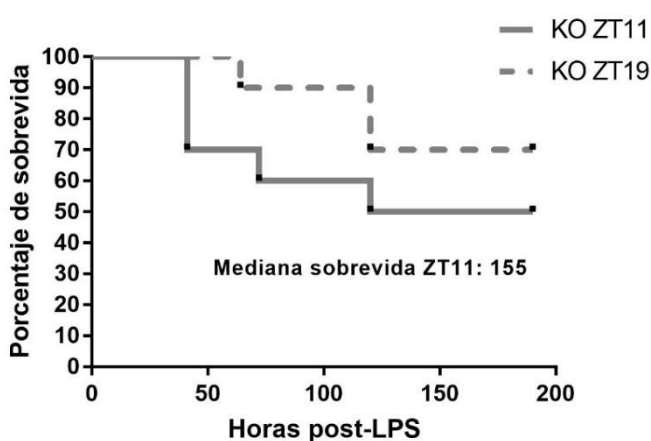
### **II.3.5 Respuesta a las dosis altas de LPS administradas en diferentes horarios en animales TNFR1 KO**

#### **II.3.5.1 Mortalidad inducida por la inoculación de dosis altas de LPS a distintos horarios en animales TNFR1 KO**

Continuando con nuestro objetivo de encontrar la o las moléculas con un posible rol en la respuesta diferencial a las dosis altas de LPS, decidimos utilizar como modelo animales TNFR1 KO (modelo animal caracterizado en el Capítulo 1 desde el punto de vista circadiano). Esto se debe a que de todas las mediciones realizadas en suero de animales tratados con dosis altas de LPS, solo

encontramos diferencias diarias en los niveles de TNF- $\alpha$  (Figura II.3.12). Por lo tanto estudiamos la respuesta al shock endotóxico inducido a ZT11 o ZT19 en estos animales. Ya ha sido reportado que los animales deficientes de alguno o ambos receptores (I y II) para TNF- $\alpha$ , son menos susceptibles al shock séptico (Pfeffer 1993; Leon 1998).

Como se puede observar en la Figura II.3.21, no se observan diferencias significativas entre las curvas obtenidas inoculando a los animales TNFR1 KO a diferentes horarios, siendo la mortalidad para el grupo de ZT11 del 50% y para el de ZT19 del 30%. Este resultado indica que la vía mediada por este receptor es clave para generar la diferencia horaria en la tasa de mortalidad observada en los controles. Adicionalmente, tal como se esperaba, el porcentaje de supervivencia de los animales TNFR1 KO es mayor al que se observó en los WT (mortalidad a ZT11: 77,66%. Figura II.3.1 de este capítulo), con una mediana de supervivencia para el grupo de ZT11 de 155 horas (WT ZT11: 52,5 horas).

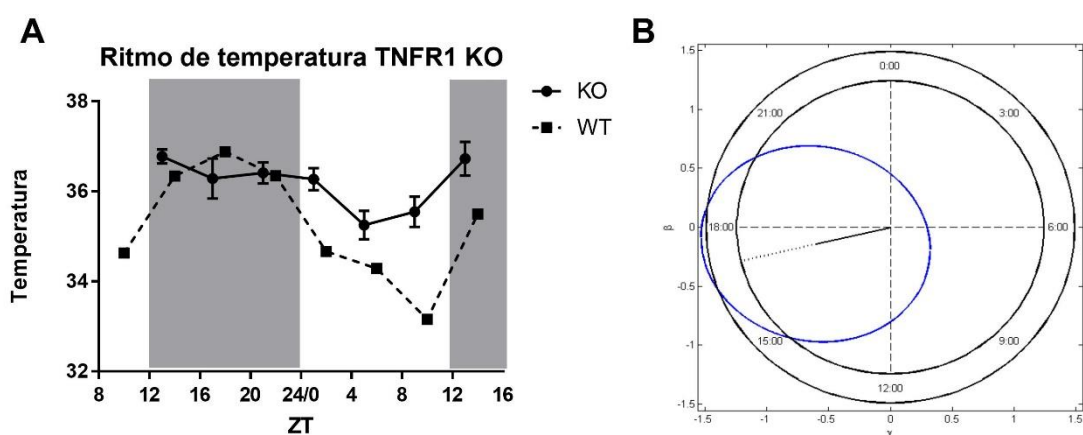


**Figura II.3.21. Curvas de supervivencia de animales C57BL6/J TNFR1 KO tratados con LPS a ZT11 (línea continua) o ZT19 (línea punteada).** Los ratones TNFR1 KO fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) a ZT11 o ZT19, y monitoreados durante 3 días para estudiar el porcentaje de supervivencia. Log-rank (Mantel Cox) test ns (n=10 por grupo). Se informa la mediana de supervivencia para el grupo que posee un porcentaje de mortalidad mayor al 50%.



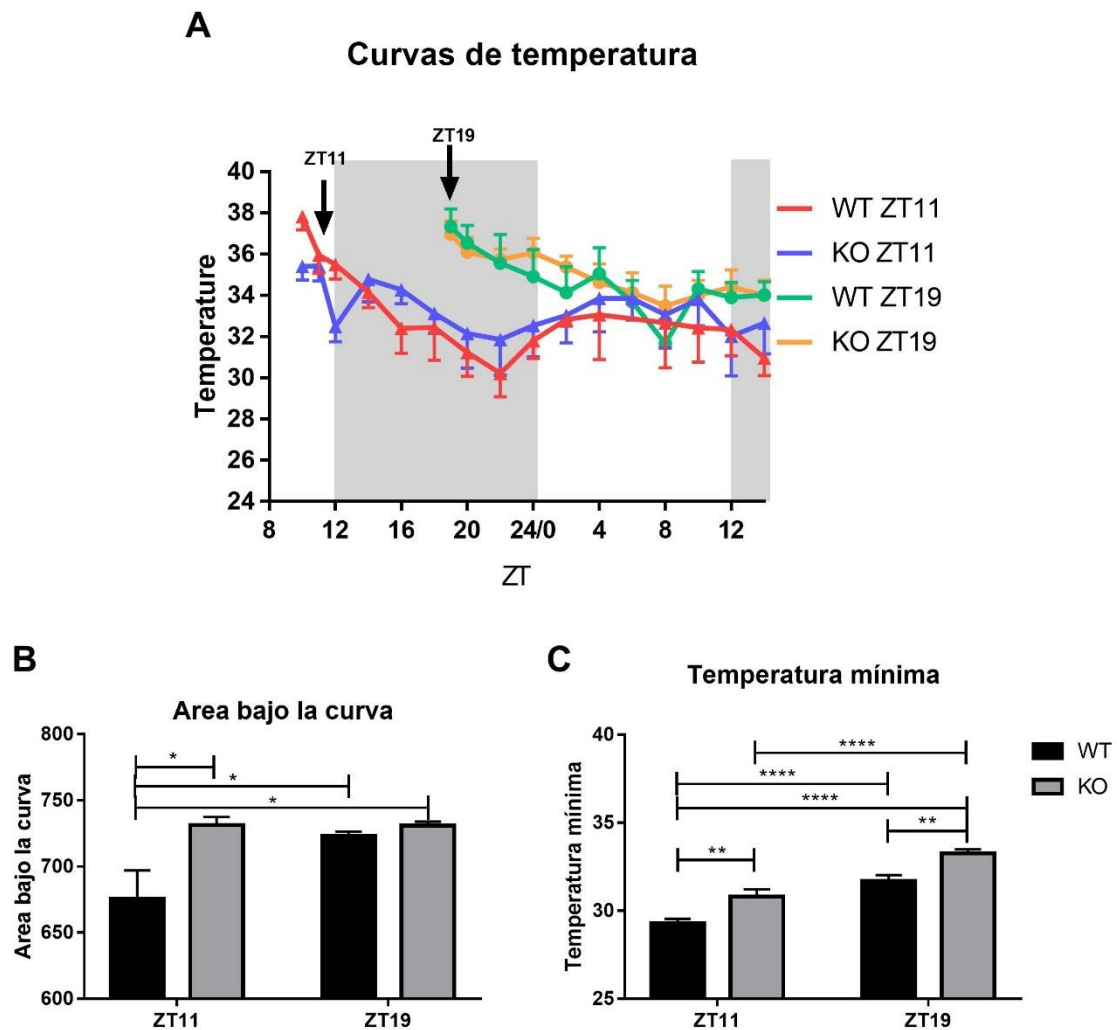
### II.3.5.2 Hipotermia en respuesta a las dosis altas de LPS a distintos horarios en animales TNFR1 KO

A continuación se analizó la respuesta hipotérmica a las dosis altas de LPS en los animales TNFR1 KO. Previamente se realizó un ritmo de temperatura en estos animales, ya que no se contaba con datos al respecto. Como se observa en la Figura II.3.22 A, estos animales presentaron una variación diaria en temperatura corporal, exhibiendo una temperatura más alta durante la noche ( $p=0.0078$ ). Sin embargo, la diferencia entre el valor máximo y el mínimo de temperatura en los animales TNFR1 KO es de  $1,52^{\circ}\text{C}$ , mientras que en los WT resultó de  $3,81^{\circ}\text{C}$ . Adicionalmente, en los animales KO el ajuste cosenoidal (Figura II.3.22 B) no resultó significativo. Estos resultados sugieren una diferencia en la regulación del ritmo diario de temperatura en estos animales en comparación con los WT.



**Figura II.3.22. Ritmo de temperatura corporal de animales TNFR1 KO en condiciones de LO12:12.** Se tomaron fotografías de cada animal cada 4hs durante 24hs, utilizando la cámara térmica *FlirOne®*. A) Ritmo de temperatura en animales TNFR1 KO. B) Test de Cosinor ( $p=0.0544$ ). ANOVA de una vía:  $p=0.0078$ , seguido de test de Bonferroni:  $p=0.0255$  ZT13 (1° día) vs ZT5,  $p=0.0350$  ZT5 vs ZT13 (2° día). El fondo gris señala las horas de oscuridad, mientras que el fondo blanco las horas de luz. La línea punteada representa el ritmo de temperatura de los animales WT mostrado en la Figura II.3.2 (n=6 por punto horario).

Seguidamente estudiamos la respuesta térmica a la inoculación de dosis altas de LPS. Como se observa en las curvas de variación de la temperatura corporal en función del ZT en la Figura II.3.23 A, los ratones TNFR1 KO desarrollan también hipotermia en respuesta al LPS, sin embargo, en estos animales nuevamente se pierde la diferencia horaria que se observa en los controles (WT). Adicionalmente, podemos observar que la hipotermia desarrollada en los KO es menor que la que desarrollan los ratones WT inyectados a ZT11 (ANOVA  $p < 0.0001$ ), mostrando valores similares a los observados en los animales WT inoculados a ZT19 (Figura II.3.23 B,  $p = 0.0163$ ). Por último, en la Figura II.3.23 C, se muestra que los animales TNFR1 KO estimulados a ZT11 alcanzaron una temperatura mínima más baja que los estimulados a ZT19; pero que los WT de cada grupo horario alcanzan temperaturas mínimas inferiores que el TNFR1 KO correspondiente al mismo horario, siendo los WT inyectados a ZT11 los que alcanzaron la temperatura mínima más baja (ANOVA factor horario y cepa  $p < 0.0001$ ).



**Figura II.3.23 Curvas de temperatura de animales WT o TNFR1 KO tratados con LPS a ZT11 o ZT19.** Los ratones TNFR1 KO y WT fueron inyectados con LPS (20 mg/kg) a ZT 11o ZT19 y se les tomaron fotografías térmicas cada 4h durante 30h utilizando la cámara térmica FlirOne®. A) Curvas de temperatura en función del ZT, B) Media  $\pm$  EEM del área bajo la curva de las 20 h posteriores al estímulo de cada una de las curvas individuales y C) Media  $\pm$  EEM temperatura mínima alcanzada por cada animal. A) ANOVA de dos vías medidas repetidas: todos los factores  $p < 0.0001$ . ANOVA de dos vías: B) factor cepa  $p = 0.0163$ ; C) factor horario y cepa  $p < 0.0001$ ; seguido de post-test de Bonferroni: B)  $p = 0.0163$  para WT ZT11 vs KO ZT11,  $p = 0.0447$  para WT ZT11 vs WT ZT19,  $p = 0.0176$  para WT ZT11 vs KO ZT19; C)  $p < 0.0001$  para WT ZT11 vs WT/KO ZT19, y KO ZT11 vs KO ZT11,  $p = 0.0064$  para WT ZT11 vs KO ZT11,  $p = 0.0058$  para WT ZT19 vs KO ZT19. (n=12 para WT ZT11, n=11 para WT ZT19, n=10 para KO por grupo).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la interacción entre TNF- $\alpha$  y TNFR1 es determinante en las diferencias diarias observadas en la tasa de mortalidad de los animales WT; y que también participaría de la respuesta

hipotérmica que se desarrolla durante el shock séptico tanto a nivel cuantitativo como determinando la diferencia diaria.

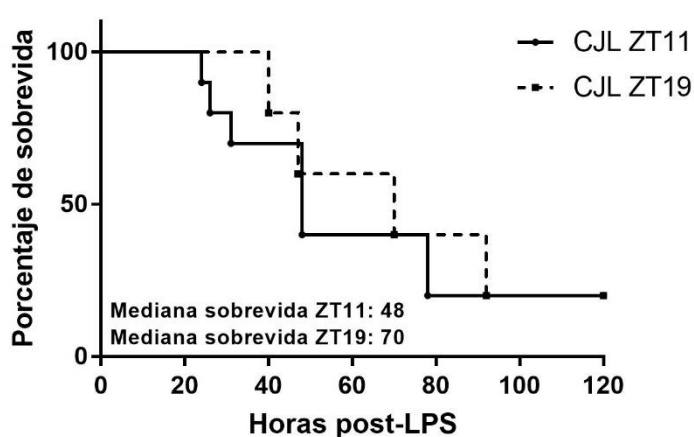
### **II.3.6 Efectos de la desincronización circadiana sobre la respuesta a las dosis altas de LPS**

#### **II.3.6.1 Mortalidad inducida por la inoculación de 20 mg/kg de LPS en animales bajo desincronización circadiana**

En resumen, hasta el momento sabemos que en condiciones de sincronización (LO 12:12) los ratones inoculados con dosis altas de LPS presentan una diferencia diaria en la mortalidad, que se ve acompañada de una hipotermia más pronunciada y niveles más altos de TNF- $\alpha$  en suero cuando la administración es a ZT11.

Estudios previos demostraron que las condiciones de desincronización circadiana incrementan la susceptibilidad al LPS (Castanon-Cervantes 2010; Fonken 2013; Guerrero-Vargas 2014). Por lo tanto, con el objetivo de estudiar la relevancia de la sincronización circadiana en este modelo, en este punto, nos propusimos estudiar la respuesta a dosis altas de LPS (20 mg/kg) en animales mantenidos bajo un protocolo de desincronización circadiana. Para ello se utilizó un protocolo de Jet Lag Crónico experimental, previamente desarrollado en el laboratorio, que consiste en adelantar 6 horas el encendido y apagado de las luces cada 2 días (JLC<sup>6/2</sup>) a partir de un ciclo LO12:12 normal (como se muestra en el esquema de la Figura II.2.1 de M y M). Como se explicó en la sección 1.4.6 de la Introducción general, este esquema de iluminación induce la desincronización del ritmo de actividad comportamental, sin inducir arritmicidad total (Casiraghi 2012). Como se observa en la Figura II.3.24, los animales

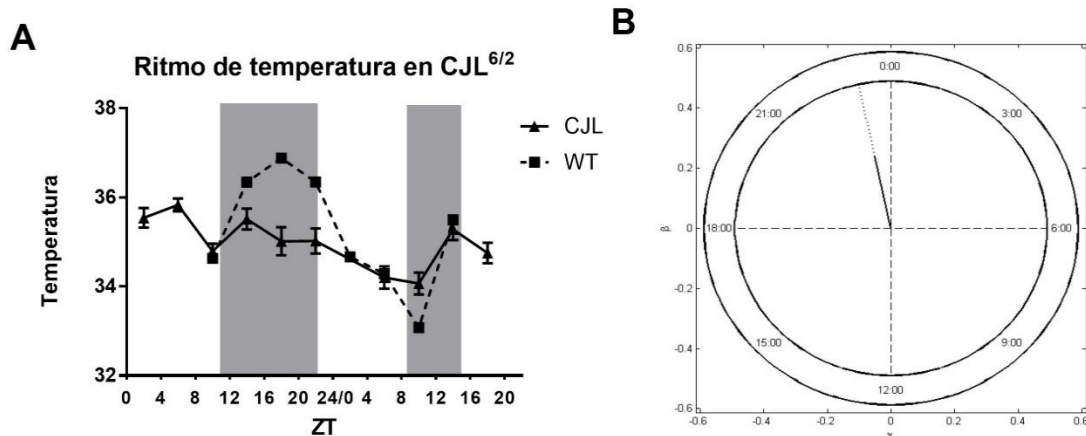
expuestos a dicho esquema tuvieron una mortalidad del 80%, independientemente del horario de inoculación (ZT11 o ZT19), mostrando curvas de supervivencia muy similares entre sí. Sin embargo, la mediana de supervivencia para el grupo estimulado a ZT11 fue de 48h, mientras que la del grupo inyectado a ZT19 fue de 70h, indicando que aún se mantienen ciertas diferencias diarias en estos animales.



**Figura II.3.24. Curvas de supervivencia de animales bajo el protocolo de JLC<sup>6/2</sup> tratados con LPS a ZT11 o ZT19.** Ratones C57BL6/J WT, mantenidos durante 3 semanas bajo el protocolo de JLC<sup>6/2</sup>, fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) a ZT11 o ZT19, y monitoreados durante 3 días para estudiar el porcentaje de supervivencia (n=10 por grupo). Se informa la mediana de supervivencia para ambos grupos.

### II.3.6.2 Hipotermia inducida por la inoculación de dosis altas de LPS en animales con desincronización circadiana

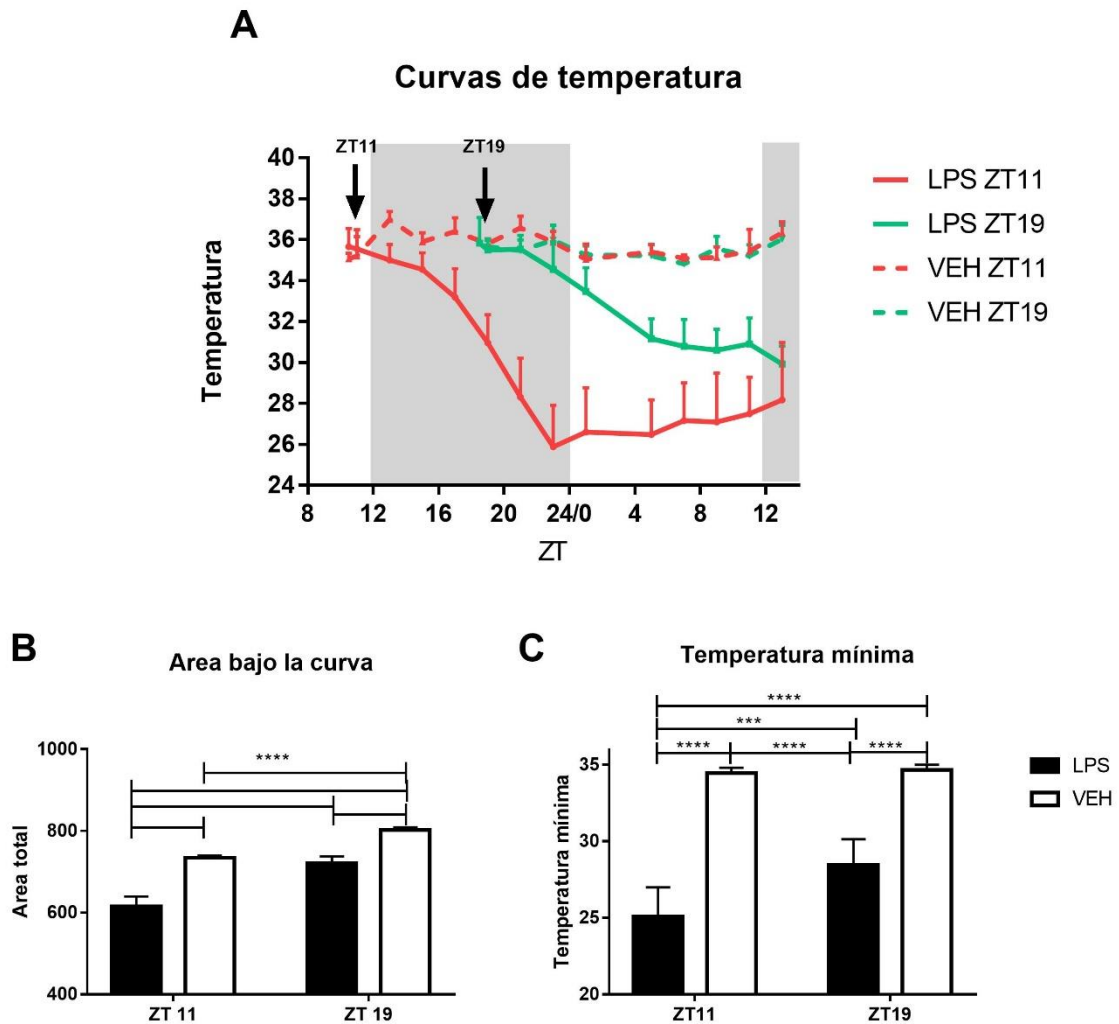
A continuación, se estudió la respuesta termoregulatoria a las dosis de LPS en estos animales, al igual que se hizo previamente con los animales sincronizados al ciclo LO 12:12. Nuevamente, antes se analizó el ritmo de temperatura corporal en los animales desincronizados. Estos animales mostraron un patrón arrítmico en la variación diaria de la temperatura corporal, como se muestra en la Figura II.3.25 A. En este caso también se realizó un ajuste cosenoidal, resultando éste no significativo (Figura II.3.25 B).



**Figura II.3.25. Ritmo de temperatura corporal de animales WT en condiciones de CJL<sup>6/2</sup>.** Se tomaron fotografías de cada animal cada 4hs durante 40hs, utilizando la cámara térmica *FlirOne®*. A) Ritmo de temperatura de animales WT en condiciones de CJL<sup>6/2</sup>. B) Test de Cosinor (ns). El fondo gris en A señala las horas de oscuridad, mientras que el fondo blanco las horas de luz. La línea punteada representa el ritmo de temperatura de los animales WT mostrado en la Figura II.3.2 (n=6 por punto horario).

En cuanto a la respuesta hipotérmica inducida por el shock séptico en los animales desincronizados, se observó que aquellos que recibieron la endotoxina a ZT11 desarrollaron una hipotermia más profunda que los que fueron inyectados a ZT19 (Figura II.3.26 A;  $p < 0.0001$ ). Esto mismo se ve reflejado en las Figuras II.3.26 B y C, donde se muestra que tanto el área bajo la curva como la temperatura mínima alcanzada son menores a ZT11 que a ZT19 (B: ANOVA  $p = 0.0099$ ; C: ANOVA  $p = 0.0109$ ). Estos resultados sugieren que se mantiene cierta sincronía en los animales mantenidos bajo este esquema de iluminación. Adicionalmente, en paralelo con estos animales se inocularon y registró la temperatura corporal de animales WT en condiciones de LO 12:12. Cuando se compararon los valores obtenidos entre animales mantenidos en LO y JLC<sup>6/2</sup> (datos no mostrados), se observó que los animales sometidos a JLC<sup>6/2</sup> desarrollaron temperaturas mínimas más bajas que aquellos mantenidos en LO (LO ZT11:  $28.06 \pm 0.7264$ ,  $n = 10$ ; LO ZT19:  $31.36 \pm 0.5026$ ,  $n = 10$ ; JLC ZT11:

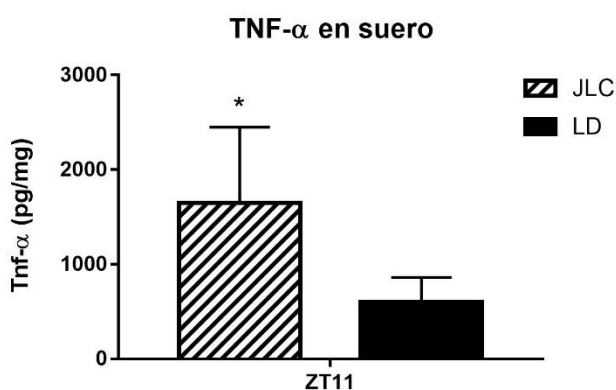
25.08 ± 0.6062; JLC ZT19: 28.48 ± 0.5283; ANOVA de dos vías: Factor esquema de luz p<0.0001, Factor horario p<0.0001). Sin embargo, no se observaron diferencias en el área bajo las curvas de temperatura, con respecto al cambio en las condiciones de luz (LO vs JLC<sup>6/2</sup>).



**Figura II.3.26 Curvas de temperatura de animales WT mantenidos bajo desincronización circadiana tratados con LPS o VEH a ZT11 o ZT19.** Ratones C57BL6/J mantenidos bajo un protocolo de desincronización circadiana (JLC<sup>6/2</sup>) durante 3 semanas fueron inyectados con LPS (20 mg/kg) o VEH a ZT11 o ZT19 y se les tomaron fotografías térmicas durante 32h utilizando la cámara térmica FlirOne®. A) Curvas de temperatura en función del ZT, B) Media ± EEM del área bajo la curva, y C) Media ± EEM temperatura mínima alcanzada por cada animal. A) ANOVA de dos vías medidas repetidas: p<0.0001. ANOVA de dos vías: B) factor horario y tratamiento p<0.0001, factor interacción p=0.0099; C) factor horario p< 0.0001, factor tratamiento p=0.0049, factor interacción p=0.0109; seguido de post-test de Bonferroni: B) p<0.0001 para LPS ZT11 vs todos los grupos, y LPS ZT19/VEH ZT11 vs VEH ZT19; C) p<0.0001 para LPS ZT11 vs VEH ZT11/ZT19, y LPS ZT19 vs VEH ZT11/ZT19, p=0.0002 para LPS ZT11 vs LPS ZT19. (n=10 para LPS y n=5 para VEH).

### II.3.6.3 Niveles de TNF- $\alpha$ en suero de animales desincronizados estimulados con dosis altas de LPS a ZT11

Dado que los animales desincronizados pierden la diferencia horaria en la tasa de mortalidad, mostrando valores similares a los observados en los controles a ZT11, y que en los controles (animales WT mantenidos en LO12:12) observamos una diferencia en los niveles de TNF- $\alpha$  en suero según el horario de inoculación, decidimos estudiar los niveles de esta citoquina en los animales con desincronización circadiana. Para ello se estimularon animales bajo el protocolo JLC<sup>6/2</sup> y condiciones normales de LO 12:12 con dosis altas de LPS a ZT11 y se midieron los niveles de la citoquina en suero. Como se muestra en la Figura II.3.27, los niveles de TNF- $\alpha$  en el suero de animales desincronizados fueron más elevados que los observados en los animales mantenidos en condiciones de LO12:12 ( $p=0.0142$ ).



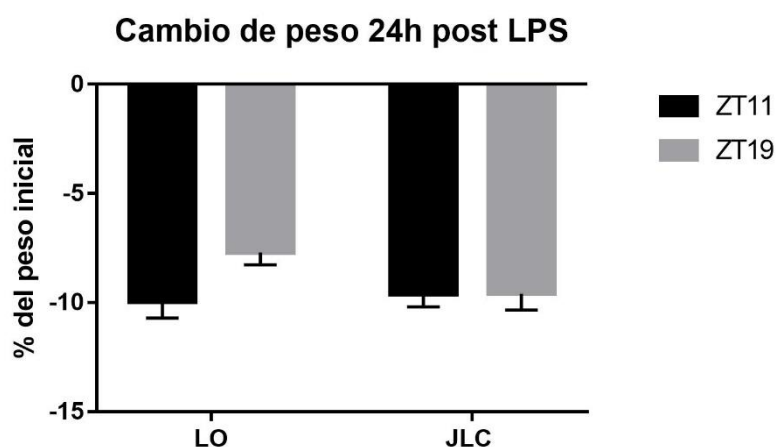
**Figura II.3.27. Niveles de TNF- $\alpha$  en el suero de animales bajo JLC<sup>6/2</sup> o LO12:12 tratados con LPS a ZT11.** Ratones C57BL6/J WT bajo el protocolo de JLC<sup>6/2</sup> durante 3 semanas o LO12:12 fueron inyectados ip con LPS (20 mg/kg) a ZT11, y 2h después se realizó la extracción de sangre. A continuación, se midieron los niveles de la citoquina TNF- $\alpha$  en suero mediante ELISA. Test de t no pareado  $p=0.0142$ . ( $n=5$  para JLC<sup>6/2</sup>,  $n=6$  para LO 12:12.)

### II.3.6.4 Disminución del peso corporal a causa del shock séptico

Todos los resultados previos indicarían que en condiciones de JLC<sup>6/2</sup> la respuesta a las dosis altas de LPS se ve exacerbada. Como se mostró en la Figura II.3.4, se observó que la pérdida de peso corporal a causa del shock séptico era diferente de acuerdo al horario de administración del LPS en



animales sincronizados. Por lo tanto, por último, se decidió analizar si la desincronización circadiana también afecta esta variable, relacionada con el comportamiento de enfermedad. Para ello se registró el peso de los animales bajo JLC<sup>6/2</sup> o LO12:12 antes y 24 horas después del estímulo inmune a ZT11 o ZT19. Como se observa en la Figura II.3.28, en los animales desincronizados no se observó una disminución diferencial del peso corporal en cuanto al horario de inoculación, dado que ambos grupos disminuyeron su peso en aproximadamente un 10% del peso inicial. Estos valores son similares a los observados en los animales mantenidos en LO12:12 estimulados a ZT11.



**Figura II.3.28. Cambio de peso de animales bajo JLC<sup>6/2</sup> o LD tratados con LPS a ZT11 o ZT19.** Se registró el peso corporal de ratones C57BL6/J WT bajo el protocolo de JLC<sup>6/2</sup> o LD 12:12 antes y 24 horas después de la inyección ip con LPS (20 mg/kg) a ZT 11 o ZT19. Se muestra el porcentaje de disminución del peso corporal en función del peso inicial. (n=10 por grupo).

En conclusión, podemos afirmar que los ratones bajo desincronización circadiana poseen una mayor mortalidad en respuesta a las dosis altas de LPS, que aquellos bajo un ciclo de LO 12:12; asimismo, pierden la diferencia diaria en la mortalidad. Sin embargo, se mantiene la diferencia en la respuesta hipotérmica, desarrollándose una mayor hipotermia en aquellos inoculados a ZT11. Adicionalmente, los animales desincronizados estimulados con LPS a ZT11 presentan mayores niveles de TNF- $\alpha$  en suero, que aquellos sometidos a un ciclo LO 12:12.



## **II.4 RESUMEN DE**

## **RESULTADOS**



- Las dosis altas de LPS inoculadas a ZT11 inducen una hipotermia más profunda (Sección II.3.1.2), junto con un mayor descenso de peso, que aquellos inoculados a ZT19. (Sección II.3.1.3)
- El LPS administrado a ZT11 induce una mayor activación de APO, NSQ y NPV que a ZT19. (Sección II.3.2.1). Asimismo, induce la expresión de *Tnf-α* como *Tnfr1* en APO y altera la BHE en respuesta al LPS a niveles similares en ambos horarios. (Sección II.3.2.2)
- El suero de animales estimulados con LPS a ZT11 induce una mayor hipotermia que el de aquellos estimulados a ZT19 al ser inoculado en animales *naive*. (Sección II.3.3.1). Es posible detectar niveles similares de LPS en estos sueros a ambos horarios. (Sección II.3.3.2)
- TNF-α es la única citoquina pro-inflamatoria cuyos niveles en suero de animales estimulados a ZT11 es mayor que a ZT19. En tanto que IL-12 se induce a niveles similares a ambos horarios de administración. (Sección II.3.3.5). Los niveles de ARNm de *Tnf-α* en hígado son mayores en animales estimulados a ZT19. (Sección II.3.4.1)
- La inoculación de LPS induce una disminución en el porcentaje de células totales y macrófagos activados en la población MPG de exudado peritoneal (Secciones II.3.4.2 y II.3.4.3), junto con un incremento de estas células y sus niveles de activación en el bazo (Sección II.3.4.3). Estas diferencias nuevamente son más pronunciadas a ZT11 que a ZT19. Adicionalmente, el porcentaje de macrófagos tipo 2 activados en bazo incrementa a niveles similares a ambos horario, sin embargo estas células presentan mayor nivel de activación a ZT11.

- Los niveles de corticosterona y de IL-10 en suero (Sección II.3.3.3), ambos mecanismos inmunosupresores, se inducen por LPS a niveles similares a ambos horarios.
- Los animales TNFR1 KO pierden las diferencias diarias en respuesta al LPS observadas en los WT, en tanto que poseen una mayor sobrevida (Sección II.3.5.1), junto con una menor hipotermia (Sección II.3.5.2) en comparación con estos últimos.
- Los animales bajo desincronización circadiana poseen una mayor mortalidad en respuesta al LPS que aquellos mantenidos en LO 12:12, perdiendo la diferencia diaria en la tasa de mortalidad (Sección II.3.6.1), pero no en la hipotermia inducida por el LPS (Sección II.3.6.2). Adicionalmente, los niveles séricos de TNF- $\alpha$  en respuesta al LPS a ZT11 son mayores en estos animales comparados con aquellos mantenidos en LO 12:12. (Sección II.3.6.3)

## **II.5 DISCUSIÓN**





### **II.5.1 Variación diaria de la mortalidad causada por el shock séptico**

En 1960, Halberg y colaboradores demostraron la existencia de una diferencia diaria en la tasa de mortalidad inducida por el shock séptico, siendo ésta mayor cuando las dosis altas de LPS se administran al final del día (Halberg 1960). Esta diferencia también fue observada en el modelo de sepsis inducido por ligación y punción cecal, con la diferencia de que se observó un cuadro más severo (mortalidad más temprana, pero igual porcentaje) cuando la cirugía fue realizada a ZT19, en comparación de ZT7 (Silver 2012). La diferencia entre los horarios de mayor severidad observados en dichos reportes podría deberse a las diferencias en la cinética de desarrollo del shock séptico entre ambos modelos.

En este trabajo confirmamos la diferencia horaria en la tasa de mortalidad inducida por dosis altas de LPS, así como la implicancia de la señalización de TNF- $\alpha$  a través de su receptor TNFR1, en esta respuesta. Estos resultados están en línea con los reportados por Hrushesky y colaboradores, los cuales demostraron que la administración periférica de TNF- $\alpha$  a distintos horarios induce una variación diaria en la mortalidad similar a la observada por la administración de LPS (Hrushesky 1994). Adicionalmente, nosotros observamos que la falta de TNFR1 abole la diferencia horaria en la respuesta a las dosis altas de LPS. El aumento de la supervivencia en animales TNFR1 KO ya había sido observado en estudios previos (Pfeffer 1993; Leon 1998), pero aún no se había estudiado la respuesta a la inducción del shock séptico en distintos horarios.

La correcta sincronización a un ciclo de LO parece ser un factor importante para la sobrevivencia del animal con shock séptico. Experimentos previos de nuestro

laboratorio demostraron que en condiciones de OO, se pierde la dependencia horaria en la mortalidad inducida por LPS, siendo los porcentajes de mortalidad observados a ambos horarios similares a los inducidos por la estimulación a ZT11 en LO 12:12 (horario de mayor mortalidad; (Marpegan 2009)). Asimismo, en 2008, Carlson y Chiu observaron que ratas sometidas a ligación y punción cecal (realizada durante el día) eran mas resistentes al shock séptico inducido por la cirugía si posteriormente a ésta eran mantenidos en un ciclo LO, a comparación de las que fueron mantenidas en OO o LL (Carlson & Chiu 2008). Estos resultados sugieren que la ausencia de claves temporales externas así como las condiciones externas desincronizantes (como LL, condiciones presentes en las unidades de cuidados intensivos, por ejemplo) pueden disminuir el porcentaje de supervivencia a la sepsis.

La importancia del sistema circadiano, y en particular del reloj molecular, en la respuesta al shock séptico, se demuestra también en trabajos realizados con animales deficientes de los genes reloj PER2 o CLOCK. Estos reportes muestran que dichos animales son más resistentes al shock séptico y que pierden la diferencia diaria en la tasa de mortalidad; lo cual se relaciona con menores niveles de citoquinas inflamatorias en suero (Liu, J. 2006; Wang 2016).

En este trabajo estudiamos la respuesta de ratones sometidos a condiciones de *jet-lag* crónico y observamos un aumento de la mortalidad junto con la pérdida de la diferencia horaria en respuesta al LPS y un aumento en los niveles séricos de TNF- $\alpha$ , confirmando una vez más la importancia de tener un reloj circadiano sincronizado para la supervivencia ante el shock séptico.

## **II.5.2 Respuesta termoregulatoria diferencial en la sepsis**

Como se discutió en la Introducción de este Capítulo, la inflamación sistémica generalmente está acompañada de alteraciones en la temperatura corporal. Tanto la fiebre como la hipotermia son signos utilizados como diagnóstico de la sepsis (Angus & van der Poll 2013), aunque la hipotermia es un marcador de peor pronóstico (Remick & Xioa 2006; Stewart 2010; Rumbus 2017).

En modelos animales, se desencadenan respuestas termoefectoras autonómicas (vasodilatación, inhibición de la termogénesis) y comportamentales (búsqueda de ambiente frío), que pueden causar fiebre o hipotermia, dependiendo de la dosis de patógeno y temperatura ambiental. La fiebre se corresponde con formas leves, y la hipotermia con formas severas de inflamación (Liu 2012; Garami 2018).

En este trabajo se analizó la respuesta termoregulatoria utilizando un dispositivo nunca antes utilizado para este tipo de estudios, que es la Cámara Térmica FlirOne®. Una de las principales ventajas de esta cámara es que de muy fácil empleo, ya que se acopla a un *SmartPhone*, se descarga una aplicación y se utiliza como la cámara de éste. Adicionalmente, se trata de una metodología que no es para nada invasiva, a diferencia de, por ejemplo, la medición de la temperatura rectal. Otra ventaja es que al obtener la fotografía térmica se tiene la información de la temperatura en cada pixel de la imagen, por lo que se puede estudiar la temperatura en cualquier parte del animal. Por último, además de imágenes también se pueden tomar videos del proceso que se desea analizar.

En cuanto a nuestro modelo de estudio, observamos que los ratones estimulados con dosis altas de LPS al final del día (fase de reposo) desarrollaron una mayor hipotermia que aquellos estimulados a mitad de la noche, correlacionando con el momento de mayor mortalidad y de mayores niveles de TNF- $\alpha$  circulante. Estos resultados son coherentes con datos reportados donde las dosis altas de LPS en roedores inducen hipotermia (Nautiyal 2009), la cual se corresponde con formas más severas de inflamación (Garami 2018). En línea con nuestros resultados, Silver y colaboradores han observado una mayor hipotermia en ratones a los cuales sometieron a ligación y punción cecal a ZT19 en comparación con aquellos operados a ZT7, correlacionando ello con una mortalidad más temprana (aunque igual porcentaje de supervivencia; (Silver 2012)). Como se mencionó anteriormente, la diferencia en el horario de mayor severidad comparado con nuestro modelo puede deberse a la diferencia en la cinética con la que se desencadena el shock séptico en cada uno de estos modelos. Adicionalmente, el modelo de sepsis por punción cecal utilizado en dicho reporte parece ser de mayor severidad que el utilizado en este trabajo, ya que induce un 100% de mortalidad en ambos grupos horarios.

Como se detectó que los niveles de TNF- $\alpha$  en suero eran distintos luego de la inoculación a ambos horarios, se estudió la respuesta hipotérmica en animales TNFR1 KO. Estos animales, además de presentar un menor porcentaje de mortalidad, mostraron una menor respuesta hipotérmica al LPS, perdiéndose la diferencia horaria en esta respuesta (aunque los TNFR1 KO inoculados a ZT11 presentaron una temperatura mínima más baja a los inoculados a ZT19). Esto indica que la señalización por TNF- $\alpha$  participa de la termorregulación en respuesta a la sepsis. Estudios previos sugieren que ésta es una citoquina

criogénica, es decir, que se trata de una molécula capaz de disminuir la temperatura corporal. Se ha observado que la administración sistémica de TNF- $\alpha$  disminuye la fiebre inducida por el LPS (Long 1992; Klir 1995). Sin embargo, otros grupos afirman que también puede participar en la respuesta pirogénica a la inflamación (Steffenl 1996; Luheshi 1997). Asimismo, el hecho de haber observado que los animales TNFR1 KO presentaron una temperatura mínima menor, indicaría que además de TNF- $\alpha$ , hay otro factor que participaría en el desarrollo de la respuesta hipotérmica. Por esta razón, sería necesario profundizar en el estudio de esta respuesta en estos animales.

Cabe destacar que esta respuesta podría estar influenciada por el ritmo de temperatura. En condiciones basales, los roedores presentan un ritmo en la temperatura corporal cuyo máximo se encuentra durante la noche (fase de actividad; (Refinetti & Menaker 1992; Scheer 2005)). Por lo tanto, los ratones estimulados a ZT11 poseen una menor temperatura basal que aquellos que se estimulan a ZT19, momento en el que se presenta el máximo de temperatura en condiciones basales. La regulación de este ritmo es mediada por los NSQ (Scheer 2005). Previamente se ha observado una respuesta diaria diferencial a un estímulo capaz de causar hipotermia, como la privación de alimento. Los animales privados de alimento (y mantenidos en frío a 20°C) durante el día (fase de reposo) sufren una mayor hipotermia que aquellos privados durante la noche; asimismo se observó un incremento en la activación neuronal de los NSQ en estas condiciones durante el día (Tokizawa 2009).

Los animales sometidos a desincronización circadiana no presentaron un ritmo de temperatura corporal. Este patrón en la temperatura ya había sido observado en roedores con lesión de los NSQ (Refinetti & Menaker 1992) o

sometidos a LL (Honma & Hiroshige 1978). Sin embargo, en nuestro trabajo estos animales sí presentaron diferencias diarias en la respuesta hipotérmica al LPS. Por lo tanto, esto sugiere que la respuesta térmica durante la sepsis es regulada por mecanismos diferentes al ritmo de temperatura corporal.

### **II.5.2.1 Estructuras hipotalámicas activadas durante la sepsis**

Las principales estructuras encargadas de la termorregulación se encuentran en el hipotálamo cerebral. Estos circuitos neuronales permiten mantener la homeostasis en la temperatura corporal, ante distintos estímulos como cambios en la temperatura ambiental o estímulos inmunes (Morrison 2016). Una de las principales regiones termosensitivas es el APO, que es capaz de sensar su temperatura como así también la de tejidos periféricos que poseen termorreceptores como la piel, distintos órganos y médula espinal (Boulant 1998; Zhao 2017; Tan & Knight 2018). Otros grupos reportaron activación neuronal en el APO de ratones que desarrollaron fiebre o hipotermia de acuerdo a la temperatura ambiental a las que se los sometía (Yoshida 2005; Uchida 2014). Por otro lado otras regiones hipotalámicas, como los NPV y los NSQ, también son capaces de recibir señales térmicas y responder modulándolas (Lu 2001; Wanner 2013; Guzman-Ruiz 2015).

En este trabajo se estudió la activación neuronal de estos núcleos en respuesta al LPS, encontrándose una mayor activación en APO, NPV y NSQ, luego de la inoculación a ZT11. Este resultado, por lo tanto, correlaciona con la mayor mortalidad y la mayor hipotermia observada en estos ratones.

Ya existían datos previos acerca de la activación neuronal en respuesta al LPS. En estudios previos realizados con distintas dosis de LPS se observó que a dosis más altas se inducen mayores niveles de cFos en distintas áreas hipotálamicas, correlacionando también con una mayor hipotermia y mayores niveles de corticosteroides en suero (Hare 1995). Pero ningún estudio ha estudiado la respuesta de estos núcleos hipotalámicos luego de la administración de dosis altas de LPS u otro estímulo inmune a distintos horarios. Por lo cual, esto constituye otro hallazgo original de este trabajo.

### **II.5.2 Comunicación neuro-inmune durante la sepsis**

Como se mencionó tanto en este capítulo como a lo largo de esta tesis, la señal inflamatoria puede llegar al SNC por distintas vías; pero aún no se conoce cuál es la vía exacta de comunicación entre el sistema inmune y el SNC durante la sepsis. En este trabajo observamos activación neuronal de distintos núcleos hipotalámicos junto con la expresión de TNF- $\alpha$  y su receptor en APO, luego de la estimulación inmune; esto estaría indicando que la señal inmune desencadenada en periferia está llegando de alguna forma al SNC.

Otros trabajos han demostrado que la inflamación inducida por dosis altas de LPS es capaz de romper la BHE (Danielski 2018), lo cual facilita el paso de citoquinas desde la circulación. Debido a esto, se estudió la integridad de la BHE en ratones estimulados a ambos horarios, y se observó una ruptura de esta estructura en respuesta al LPS, independientemente del horario de administración. Esto indica que la activación neuronal diferencial en el hipotálamo no se debería a una alteración diferencial de la BHE de acuerdo al

horario de administración del LPS. Sin embargo, podría facilitar el pasaje de los mayores niveles de TNF- $\alpha$  encontrados en suero.

Adicionalmente, la señal inmune podría llegar diferencialmente al SNC por otra vía de comunicación como el nervio vago, o los órganos circumventriculares. En un modelo de sepsis por ligación y punción cecal se observó que la estimulación del nervio vago, produce un descenso en los niveles de moléculas inflamatorias, debido a la activación del “reflejo inflamatorio” que induce la liberación de acetilcolina en periferia (Borovikova 2000; Andersson & Tracey 2012). Este neurotransmisor actúa disminuyendo la expresión de moléculas inflamatorias por parte de los macrófagos (Borovikova 2000; Pavlov & Tracey 2012) a través de un mecanismo dependiente del plexo celíaco (ver Figura 3.1.1 de la Introducción general) y del bazo (Huston 2006; Rosas-Ballina 2008). En línea con estos datos, la vagotomía disminuye el número de células inmunes en el bazo (Mihaylova 2014), en tanto que aumenta la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Bernik 2002) en animales inoculados con dosis altas de LPS.

En este trabajo también se evidenció que la señal inmune llega al eje HPA, estimulando la secreción de corticosterona; sin embargo, esta fue independiente del horario de administración de las dosis altas de LPS. Existen evidencias de aumentos en los niveles de cortisol en sangre en pacientes con sepsis, sin embargo esto es muy variable (Schein 1990). Además, se reportó que los niveles basales elevados de cortisol se correlacionan con un alto nivel de mortalidad en los hospitales (Kwon 2007). En estudios con modelos animales la sepsis también induce un aumento de los niveles de glucocorticoides (Yamashita 2017). Por otro lado, el incremento de los niveles de glucocorticoides durante la sepsis depende



de la citoquina IL-10, dado que ratones deficientes de esta citoquina presentan mayores niveles de esta hormona (Cordoba-Moreno 2018).

Todos estos resultados evidencian que la comunicación entre el SNC y los tejidos periféricos durante la sepsis es compleja, y por lo tanto no existe una sola vía de comunicación, sino que éstas actúan en conjunto. Dado que existen muchas evidencias de que la respuesta durante el shock séptico varía según el horario en el cual este se desencadena, uno de los objetivos principales de este trabajo fue identificar el factor o los factores responsables de esta diferencia, entre los cuales pueden estar las vías de comunicación entre el sistema inmune y el SNC que mencionamos previamente.

### **II.5.3 Respuesta inflamatoria diferencial durante el shock séptico**

#### **II.5.3.1 Respuesta inflamatoria a nivel central**

Entonces, como se discutió en la sección anterior, la inflamación periférica inducida en pacientes con sepsis, puede llegar al SNC por distintas vías. Dicha señalización induciría la activación de células gliales, las cuales son capaces de secretar moléculas inflamatorias, e inducir neuroinflamación (Meneses 2019).

A fin de profundizar en el conocimiento de los mecanismos que regulan la diferencia diaria en la respuesta hipotérmica y en la activación neuronal hipotalámica, hipotetizamos que la señal inflamatoria periférica podría inducir la expresión de citoquinas o sus receptores en APO de manera diferencial de acuerdo al horario de administración. Como existen varios indicios del importante rol de TNF- $\alpha$  y su receptor TNFR1, tanto en la comunicación inmune-circadiana, como en la regulación de la respuesta hipotérmica, decidimos estudiar la expresión de estas moléculas en APO en respuesta a dosis altas de LPS. Sin

embargo, observamos que ambas moléculas se inducen en respuesta al shock séptico en APO, pero independientemente del horario de estimulación, indicando que podrían participar del mecanismo de termorregulación pero no de su diferencia horaria. Sin embargo, dado que medimos niveles de ARNm mensajero y no proteína, no podemos descartar que lleguen niveles diferenciales de ésta molécula desde la periferia, activando esta área hipotalámica en forma diferente según el horario.

Adicionalmente, hasta el momento no existían evidencias de la expresión de esta citoquina y su receptor en esta región hipotalámica en respuesta a las dosis altas de LPS, lo cual fue demostrado en este trabajo.

### **II.5.3.2 Respuesta inflamatoria a nivel periférico**

Adicionalmente, quisimos estudiar si la respuesta horaria diferencial observada en este modelo se debía a una o varias moléculas presentes en el suero de los ratones sépticos. Para ello, en primer lugar, inoculamos suero de animales q recibieron dosis altas de LPS a ZT11 o ZT19, en animales *naive* (a ZT13), a fin de evaluar si en estos sueros había alguna/s moléculas/s responsables de la diferencia horaria observada en la temperatura corporal. En efecto, observamos que aquellos animales que recibieron el suero de ratones estimulados a ZT11, desarrollaron una mayor hipotermia, que aquellos que fueron inyectados con el suero de animales inoculados a ZT19. Es decir, que el suero de estos animales generó una respuesta similar al LPS. Luego de comprobar que, efectivamente, la respuesta hipotérmica diferencial podría estar relacionada a una o más moléculas presentes en el suero, nos propusimos estudiar su composición.

En un principio se decidió analizar si el LPS inyectado por vía ip era capaz de llegar a la circulación, ya que no hay reportes previos que hayan estudiado esto luego de la estimulación con estas dosis de LPS. La presencia de LPS en suero podría correlacionar con una mayor diseminación de la endotoxina hacia otros tejidos, lo cual podría aumentar la severidad de la patología. En este trabajo observamos que 2 horas después de la inoculación se detectó la presencia de la endotoxina en el suero de los ratones, pero este aumento fue independiente del horario de administración. En pacientes con sepsis se ha observado la presencia de LPS y LBP en suero (Opal 1999; Zweigner 2001); mientras que en modelos animales se observó que la proteína LBP tiene funciones protectoras contra el shock séptico (Jack 1997; Lamping 1998).

Como ya mencionamos en la introducción de este capítulo, durante la sepsis se desencadenan tanto procesos pro-inflamatorios como anti-inflamatorios. Un exceso de pro-inflamación podría llevar al daño tisular, mientras que un exceso de anti-inflamación puede llevar al desarrollo de infecciones secundarias (van der Poll & Opal 2008). Por lo tanto, ambos factores podrían agravar el cuadro séptico. Por esta razón, se estudiaron los niveles de glucocorticoides en suero, los cuales tienen una gran variedad de funciones, entre ellas inmunosupresoras (Stahn & Buttgereit 2008; Ayroldi 2012). Además, en modelos animales de shock séptico se ha demostrado que esta molécula disminuye la mortalidad de estos ratones, a través de sus acciones anti-inflamatorias (Dejager 2010; Gilibert 2014). En nuestro modelo se observó una inducción de corticosterona en suero en respuesta al LPS, pero en niveles similares a ambos horarios. Esto sería indicativo de que no hay una activación diferencial del eje HPA dependiente del horario de estimulación, y que los

glucocorticoides circulantes no serían los responsables de la respuesta horaria diferencial observada. Sin embargo, existen evidencias de la existencia de ritmos en los niveles de receptores para glucocorticoides (Xu 1991), por lo tanto no se podría descartar que se produzca una señalización diferencial a través de ellos.

Siguiendo con los mecanismos anti-inflamatorios, también observamos que los niveles séricos de la citoquina IL-10 aumentaron a niveles similares en animales inoculados a ambos horarios. Este resultado está en línea con el resultado obtenido en los niveles de corticosterona. Estos datos sugieren que la respuesta horaria diferencial al shock séptico no estaría determinada por estos parámetros anti-inflamatorios. Sin embargo, otros trabajos han demostrado una relación entre la citoquina IL-10 y los glucocorticoides durante el shock séptico, observando que animales deficientes de IL-10 poseen una mayor mortalidad, junto con un incremento en los niveles de glucocorticoides y de citoquinas pro-inflamatorias (Cordoba-Moreno 2018). Por lo tanto, sería interesante estudiar qué sucede con esta citoquina a otros tiempos distintos a los estudiados.

También se analizaron los niveles de endocannabinoides en suero. Se ha demostrado que estas moléculas poseen una estrecha relación con los procesos inflamatorios incrementando sus niveles en respuesta al LPS (Szafran 2015), así como en pacientes con shock séptico (Wang 2001). Adicionalmente, la señalización a través de su receptor CB2 protege a los roedores del shock séptico (Csoka 2009), y se los ha relacionado con la hipotermia y la hipotensión inducidas por la administración de altas dosis de LPS (Villanueva 2009; Steiner 2011; Schindler 2017). Sin embargo, a pesar de estas evidencias, no observamos variaciones de los niveles séricos del endocanabinoide 2-AG en

nuestro modelo. Es posible que el horario, al igual que el tejido, elegidos no hayan sido los adecuados para la detección de esta molécula.

La inducción de la “tormenta de citoquinas” es una de las principales características del shock séptico (Chen 2014), donde TNF- $\alpha$  es una de las principales citoquinas involucradas. Como también se menciona previamente (sección II.1.1.4), la falta de señalización mediada por TNF- $\alpha$  en ratones induce una resistencia parcial al shock séptico (Tracey 1987; Mohler 1993; Pfeffer 1993; Opal 1999; Guo 2009). Además, ha sido sugerido que la secreción de TNF- $\alpha$  soluble a la circulación, el cual depende de su clivaje por parte de la enzima TACE (también conocida como ADAM17), sería uno de los principales responsables en la inducción del shock séptico (Mishra 2016). En este trabajo demostramos un incremento en los niveles séricos de esta citoquina en respuesta a la estimulación con dosis altas de LPS a ZT11. Este resultado junto con la disminución de la tasa de muerte y de los niveles de hipotermia observados en animales TNFR1 KO refuerzan dichas evidencias. Sin embargo, esta vía no sería la única responsable del shock séptico dado que los animales TNFR1 KO aun presentan niveles de mortalidad e hipotermia, aunque menores que los animales WT. El tratamiento de pacientes sépticos con antagonistas de TNF- $\alpha$  tiene resultados controversiales, que podrían deberse a la complejidad y diversidad de la respuesta al shock séptico observada en pacientes. Esto, además, podría estar relacionado con la inducción diferencial de TNF- $\alpha$  de acuerdo al horario en el que se desencadena el shock séptico en nuestro modelo. Por lo tanto, dicha complejidad en la respuesta al shock séptico observada en pacientes, podría deberse al horario en el que se inició la respuesta séptica

Por otro lado, la citoquina IL-12 aumentó en suero en igual magnitud en animales inoculados a ambos horarios sugiriendo que participa en la respuesta al LPS pero no de la diferencia horaria observada.

Sin embargo, al analizar los niveles de TNF- $\alpha$  en hígado y bazo, no observamos alteraciones luego del tratamiento con LPS; aunque sí se evidenció un aumento en la expresión de *Tnf- $\alpha$*  luego de la estimulación a ZT19 en tejido hepático, compatible con la inducción de la respuesta de fase aguda (Kubes 2016). En otro estudio en el que se utilizó una dosis similar de LPS, se observó un aumento de los niveles de expresión de citoquinas en hígado, entre las que se encontraba *Tnf- $\alpha$* , a las 24h después del estímulo (Wu 2018). Por lo tanto, es posible que esta variable deba estudiarse a otros horarios. Otra posible hipótesis es que la expresión en hígado de esta citoquina se produzca más rápido luego de la estimulación a ZT11, y por lo tanto hayamos perdido el pico de expresión.

### **II.5.3.3 Respuesta de macrófagos al shock séptico**

Los macrófagos son una de las primeras células que se activan en respuesta a un patógeno, ya que reconocen los PAMPs presentes en ellos a través de sus RRs. Al activarse se desencadena la respuesta inflamatoria, mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y otros mediadores inmunes, como quemoquinas, especies reactivas de oxígeno, etc. (Cinel & Opal 2009). Poseen un rol esencial durante todas las fases de la sepsis, debido a su presencia ubicua y sus funciones tanto homeostáticas como inflamatorias (Cheng 2018).

Por lo tanto, decidimos estudiar los porcentajes y niveles de activación de estas células en la cavidad peritoneal y en bazo. Como la inyección de LPS es

intraperitoneal, los macrófagos presentes en esta cavidad serían los primeros en activarse. Estos macrófagos se pueden clasificar de acuerdo a su morfología en macrófagos peritoneales grandes y pequeños (MPG y MPP, respectivamente; (Cassado Ados 2015)). Los MPG constituyen aproximadamente el 90% de los macrófagos peritoneales en animales no estimulados, pero sus niveles disminuyen rápidamente en respuesta a estímulos como LPS o tioglicolato. Estas células, además, expresan altos niveles de TLR4 y moléculas co-estimuladoras (entre ellas CD86). Por su parte, los MPP expresan menores cantidades de estos marcadores y aumentan en respuesta a la estimulación, pero este aumento no suele darse tan rápidamente (Ghosn 2010).

En línea con los datos mencionados, en este trabajo observamos que en la población MPG, tanto el porcentaje de células totales como el de macrófagos activados ( $F4/80^+CD11b^+CD86^+$  y  $F4/80^{alto}CD11b^{alto}CD86^+$ ), disminuye significativamente en respuesta a las dosis altas de LPS administradas a ZT11. Sin embargo, los macrófagos totales disminuyen independientemente del horario de estimulación. Ha sido reportado que debido a la excesiva inflamación generada durante la sépsis, se induce un gran número de factores que promueven la apoptosis de los macrófagos peritoneales (Zhu 2009; Luan 2015). En otro modelo de infección causado por la bacteria *Enterococcus faecium* se demostró que los macrófagos peritoneales son importantes en la contención de la infección, al evitar que ésta se disemine, y regular el proceso inflamatorio. Por lo tanto, una disminución de estas células sería contraproducente para el huésped (Leendertse 2009). Adicionalmente, en el caso de los MPG esta disminución en sus niveles dentro de la cavidad peritoneal podría estar

relacionada con su migración hacia otros sitios del organismo (Okabe & Medzhitov 2014).

En la población MPP, no se observaron alteraciones en el porcentaje o niveles de activación de los macrófagos en respuesta al LPS. Aunque sí se observó una variación diaria en el porcentaje de células totales en esta región, siendo estos valores mayores a ZT11 (observado en los vehículos).

Como se menciona previamente, la activación de los MPP es posterior a la de los MPG (Ghosn 2010). Existen evidencias de que la disminución en los niveles de MPG en respuesta a un estímulo inflamatorio se ve acompañada de un aumento en los MPP y de la llegada de monocitos inflamatorios a la cavidad peritoneal (Davies 2011; Cassado Ados 2015). Este factor correlaciona con la renovación y mejora de las condiciones de la cavidad peritoneal, para responder ante el estímulo inmune (Cassado Ados 2015). Por lo tanto, es probable que un análisis del porcentaje de macrófagos dentro de esta población a tiempos posteriores evidencie alteraciones en sus niveles, ya que los monocitos que llegan desde la circulación se diferencian a macrófagos que pasan a ser parte de los MPP (Ghosn 2010).

Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que los MPP desarrollan un perfil pro-inflamatorio en respuesta al LPS, ya que al ser estimulados producen niveles altos de citoquinas pro-inflamatorias, entre las que se encuentra TNF- $\alpha$  (Cain 2013). En este trabajo hemos observado una variación diaria en el porcentaje de esta población de macrófagos, con mayores niveles a ZT11. Por lo tanto, este resultado podría estar relacionado con los mayores niveles de TNF- $\alpha$  detectados en circulación luego del estímulo con LPS a ZT11. Hasta el momento no existen otros trabajos que hayan estudiado la existencia



de ritmos en los niveles de ambas poblaciones de macrófagos peritoneales, lo cual entonces sería un hallazgo de esta investigación.

Por otro lado, los macrófagos de bazo son también un componente importante de la respuesta inmune innata (Liu, G. 2006). En este trabajo, observamos un aumento en el porcentaje de macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) en bazo en respuesta al LPS a ZT11, al igual que en el porcentaje de macrófagos activados (F4/80<sup>+</sup>-CD86<sup>+</sup>), mientras que a ZT19 estos parámetros resultaron similares a los controles. Otros trabajos han evidenciado un aumento en la expresión de CD86 en estos macrófagos en respuesta al LPS (Liu, G. 2006), pero no se encontraron trabajos que estudien esta respuesta a distintos horarios.

En cuanto a los perfiles de activación de los macrófagos han sido descritas dos subpoblaciones: los activados por la vía clásica o M1, y los activados por la vía alternativa o M2. Los macrófagos de tipo M1 se caracterizan, entre otras cosas, por la producción de citoquinas pro-inflamatorias, la respuesta a patógenos y; mientras que los de tipo M2 están asociados con funciones anti-inflamatorias y de homeostasis (Zhang & Wang 2014; Sica 2015). Si bien el porcentaje de macrófagos tipo 2 (identificados como F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>) en bazo no se modificó en respuesta al LPS, observamos un incremento en el porcentaje de estas células que expresan CD86, así como en los niveles de fluorescencia de este marcador (IMF para CD86), a ambos horarios estudiados. Sin embargo a ZT11 la IMF de CD86 resulto levemente mayor que a ZT19. Este resultado nuevamente se condice con los obtenidos en la medición de moléculas inmunosupresoras como los glucocorticoides, y la citoquina IL-10, que también se indujeron en respuesta al LPS independientemente del horario. Existen evidencias de que la excesiva inflamación durante el shock séptico puede llevar

a la apoptosis de los macrófagos M1 o a su polarización hacia el fenotipo M2, contribuyendo a la inmunosupresión (Krausgruber 2011; Sindrilaru 2011). Asimismo, ciertas citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13, IL-10 pueden inducir la polarización de los macrófagos M1 a M2 (Sica 2015; Ip 2017). Aunque nuevamente, no hemos encontrado resultados de otros grupos que investiguen estas variables a distintos horarios.

### **II.5.2 Efectos de la desincronización circadiana en la respuesta al shock séptico**

Como ya lo mencionamos en la sección II.1.4.1 de la introducción de este capítulo, la desincronización circadiana es capaz de generar alteraciones en distintos sistemas y funciones, incluyendo el sistema inmune. Existen evidencias de que la desincronización generada por la exposición a ciclos de jet-lag crónico, es capaz de alterar distintos factores y funciones inmunes (Castanon-Cervantes 2010; Adams 2013). Por lo tanto, en este trabajo estudiamos la respuesta al shock endotóxico en animales sometidos a un ciclo de JLC<sup>6/2</sup>. Estos ratones presentaron una tasa de mortalidad alta independientemente del horario en el que se les administró la endotoxina. Ambos grupos presentaron una mortalidad del 80%, lo que significa que se perdió la diferencia diaria en respuesta al shock séptico. Carlson y colaboradores también evidenciaron una menor supervivencia en animales sometidos a ligación y punción cecal mantenidos bajo condiciones disruptivas del ciclo circadiano (luz constante) luego de la operación (Carlson & Chiu 2008). Por su parte, Castanon-Cervantes y colaboradores, observaron un aumento en la mortalidad en respuesta a LPS de animales sometidos a 4

cambios de fase agudos, uno por semana, del ciclo de LO (Castanon-Cervantes 2010).

Sin embargo, en los animales de nuestro modelo se conserva la respuesta hipotérmica diferencial de acuerdo al horario en el que se inoculó el LPS como sucede en los animales mantenidos en LO12:12. Este último resultado sugiere que el mecanismo responsable del desarrollo de la respuesta hipotérmica mantiene su sincronía en los animales mantenidos bajo este esquema de iluminación. Sin embargo, si se compara los niveles de hipotermia desarrollados por los animales mantenidos en condiciones de JLC<sup>6/2</sup> con aquellos mantenidos en LO12:12, los animales desincronizados manifiestan una menor temperatura mínima con respecto a aquellos sincronizados e inyectados en ese mismo horario (ZT11 o ZT19). Como se menciona previamente, resultados previos del grupo de Alec Davidson también mostraron que los ratones sometidos a los cambios del ciclo LO, desarrollaron una mayor hipotermia que los controles (Castanon-Cervantes 2010), pero los animales no fueron estimulados a distintos horarios.

Adicionalmente, se estudiaron los niveles séricos de TNF- $\alpha$  en los animales desincronizados estimulados a ZT11 (los cuales presentan una respuesta exacerbada), observándose niveles mayores de esta citoquina en comparación con aquellos mantenidos en condiciones de LO12:12.

Por lo tanto, la desincronización circadiana genera un aumento en la mortalidad de los animales estimulados con dosis altas de LPS, y además, se pierde la diferencia diaria, produciéndose un aumento de la mortalidad en aquellos inoculados a ZT19. Esto se condice con el desarrollo de una mayor hipotermia, aunque en este caso no se pierde la diferencia diaria; y con un

incremento de los niveles de TNF- $\alpha$  en suero, en aquellos animales inyectados a ZT11, comparados con los mantenidos en condiciones de LO 12:12. Como podemos observar, nuevamente, mayores niveles de TNF- $\alpha$  sérico correlacionan con el desarrollo de una hipotermia más profunda.

## **II.6 CONCLUSIONES**

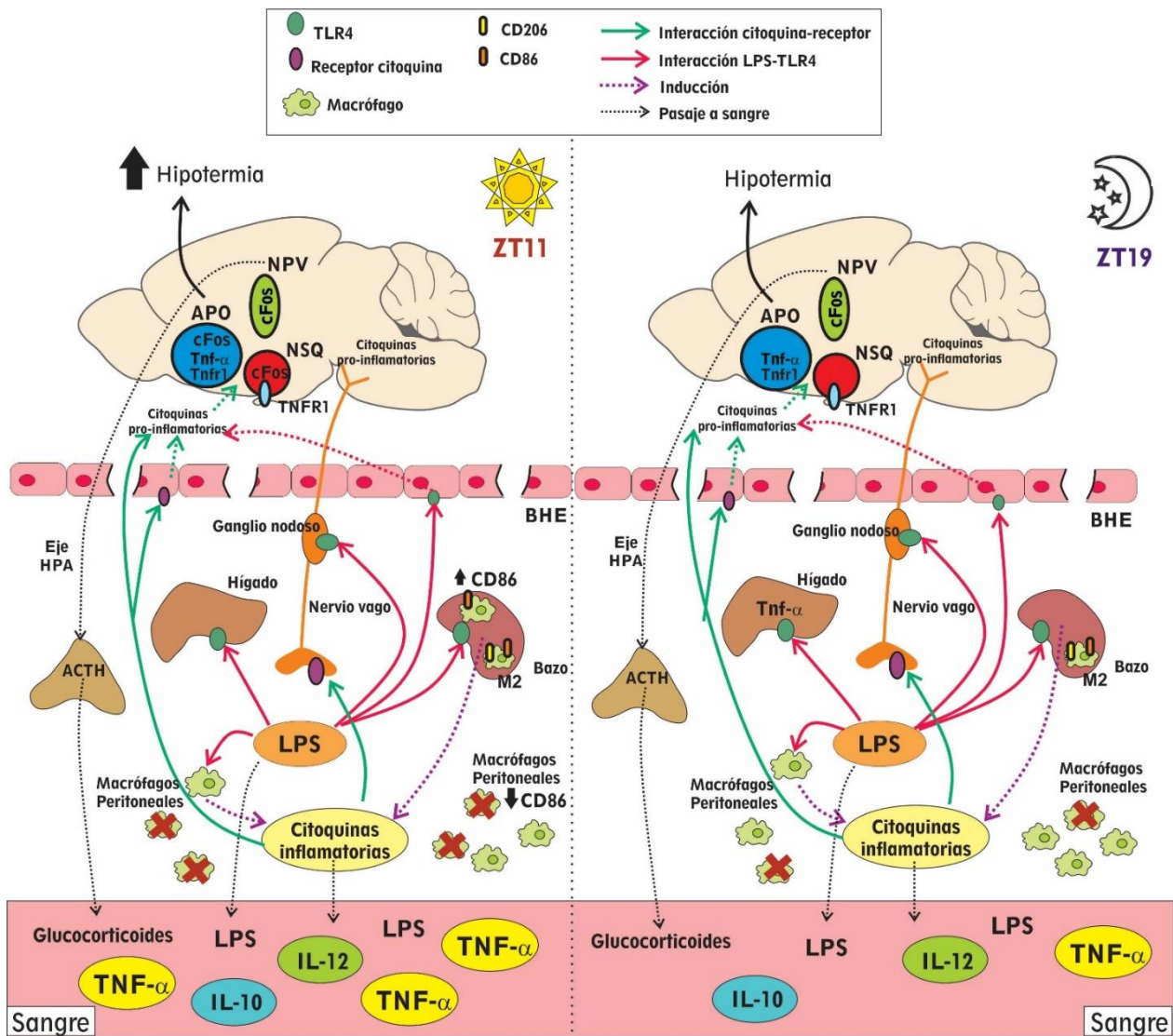
En este Capítulo demostramos que la diferencia diaria en la mortalidad inducida por dosis altas de LPS se ve acompañada por una diferencia diaria en la respuesta hipotérmica y activación del APO, NSQ y NPV hipotalámicos. Esta variación en la respuesta estaría vinculada a la señalización de TNF- $\alpha$  mediante TNFR1, citoquina que podría estar siendo secretada por los macrófagos que se activan en la periferia en respuesta al LPS. Por último, la desincronización circadiana exacerba la mortalidad, perdiéndose la diferencia diaria en esta respuesta e induciendo mayores niveles de hipotermia, aunque en este caso se mantiene la diferencia diaria.

En la Figura II.6.1 se observa un resumen de los resultados diferenciales obtenidos en este capítulo. Los resultados obtenidos en este capítulo nos indicarían que las dosis altas de LPS por vía intraperitoneal actúan sobre los macrófagos peritoneales, induciendo su activación y posterior secreción de mediadores inmunes, entre ellos citoquinas como TNF- $\alpha$ . Dicha activación masiva produce un descenso en los niveles de las células de la población MPG, especialmente luego de la estimulación a ZT11. A su vez, tanto la endotoxina como las citoquinas inducidas pueden pasar a circulación y actuar sobre el bazo, induciendo la activación de los macrófagos allí presentes luego del estímulo a ZT11, los cuales también podrían secretar TNF- $\alpha$ . Asimismo, se produce un aumento en la activación de los macrófagos de tipo M2 allí presentes. Toda esta respuesta, en conjunto, induce un incremento de los niveles de TNF- $\alpha$  en suero, más pronunciado a ZT11. Asimismo, tanto el LPS como las citoquinas inducidas pueden señalizar al SNC atravesando la BHE, que se rompe en respuesta al LPS, como así también, señalizando a través del nervio vago (o de los órganos

circumventriculares). Al llegar esta señal al SNC, se produce la activación de NSQ y APO, luego de la administración de LPS a ZT11; y de NPV a ambos horarios (aunque mayor a ZT11), y se produce la expresión de *Tnf- $\alpha$*  y *Tnfr1* en APO. Se hipotetiza que la activación de estos núcleos hipotalámicos desencadena la respuesta hipotérmica, la cual es más pronunciada a ZT11. Además, la activación de los NPV que forman parte del eje HPA genera la secreción de corticosterona a partir de la glándula adrenal (aunque ésta no sería responsable de la diferencia temporal en la respuesta al LPS).

Todos estos efectos dependen de la señalización mediada por TNF- $\alpha$  y su receptor TNFR1, ya que de no estar presente este último, se pierde la respuesta diferencial en la mortalidad e hipotermia. Además, se ha observado que la desincronización circadiana exacerba estos efectos.

En resumen, en este capítulo profundizamos en el conocimiento de los mecanismos subyacentes al efecto cronodependiente del LPS que desencadena una respuesta séptica diferencial a lo largo del día. Nuevamente la citoquina TNF- $\alpha$  jugaría un rol preponderante en la señalización temporal en este modelo, lo cual puede considerarse un punto de partida para eventuales diagnósticos o tratamientos de sepsis o shock séptico que tengan en cuenta el horario de la injuria.



**Figura II.6.1 Resumen de los resultados obtenidos en el capítulo 2.** A la izquierda se muestran la respuesta observada tras la inoculación de dosis altas de LPS a ZT11, y a la derecha la respuesta desencadenada a ZT19. La administración de LPS actúa sobre los macrófagos peritoneales, induciendo su activación y la secreción de citoquinas inflamatorias. Los niveles de macrófagos peritoneales disminuyen con el estímulo inmune, observándose menor activación de estas células a ZT11. Tanto el LPS como las citoquinas secretadas actuarían sobre el hígado induciendo un aumento en la expresión de *Tnf-α*. A su vez, ambos también podrían actuar sobre el bazo induciendo una mayor activación de macrófagos totales y M2 luego de la inoculación a ZT11 y un incremento en el porcentaje de macrófagos M2 a ambos horarios. Las citoquinas secretadas por los macrófagos, o por otros tejidos pasan a circulación, produciéndose un aumento de IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$ , siendo los niveles de ésta última mayores a ZT11. También se detectaron niveles de LPS en sangre. Adicionalmente, la endotoxina y las citoquinas, pueden ingresar al tejido del SNC a través de la BHE que se rompe en respuesta a las dosis altas de LPS, o señalizando a través del nervio vago, por ejemplo. Esta comunicación induce la activación de los NSQ y APO luego de la inoculación a ZT11, mientras que los NPV se activan independientemente del horario (aunque en mayores niveles a ZT11). Asimismo se induce la expresión de *Tnf-α* y *Tnfr1* en APO. Esta activación hipotalámica desencadena hipotermia, la cual es más profunda a ZT11. Adicionalmente, se activa el eje HPA, induciendo secreción de glucocorticoides en periferia, independientemente del horario.





# **ANEXO**

## **Efectos de la inflamación pulmonar crónica sobre los ritmos circadianos**



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **Hipótesis general:**

*La inflamación pulmonar crónica puede alterar los ritmos circadianos en un modelo murino de asma.*

## **Hipótesis específicas:**

- La inflamación pulmonar crónica es capaz de generar inflamación en el SNC, específicamente en los NSQ.
- La inflamación pulmonar crónica puede alterar los ritmos circadianos de actividad locomotora.

Por lo tanto el **objetivo general** de este anexo es estudiar la respuesta del sistema circadiano ante un modelo de inflamación pulmonar crónica.

## **Objetivos específicos:**

1. Desarrollar un modelo de inflamación crónica pulmonar capaz de generar inflamación en los NSQ de los animales tratados.
2. Analizar la activación inmune en NSQ, suero y tejido pulmonar.
3. Estudiar la existencia de modificaciones circadianas en un modelo de asma en ratones WT.



## **III.1 INTRODUCCIÓN**



### **III.1.1 Características de las reacciones de hipersensibilidad**

Las enfermedades comúnmente conocidas como enfermedades alérgicas: rinitis alérgica, asma, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, etc., son parte de un grupo de patologías denominadas reacciones de hipersensibilidad tipo 1. Afectan al 25% de la población mundial, y son mediadas por anticuerpos desarrollados en respuesta a antígenos inocuos (alérgenos) para la mayoría de las personas (Fainboim 2011).

En un primer encuentro con el alérgeno, etapa de sensibilización, se induce una respuesta inmune adaptativa contra esta molécula en la cual se producen los anticuerpos específicos de isotipo IgE. En los siguientes encuentros con el alérgeno, este es reconocido por los mencionados anticuerpos induciendo la degranulación de los mastocitos (células que presentan receptores de alta afinidad para IgE). Dichos gránulos poseen elevadas concentraciones de histamina, molécula que induce broncoconstricción (broncoespasmo), hipotensión arterial, y aumento de la permeabilidad vascular, etc. A esta respuesta se suma la producción de citoquinas y quemoquinas por los mastocitos, lo que promueve el desarrollo de una respuesta inflamatoria local, que recluta macrófagos y eosinófilos (Fainboim 2011). En este tipo de respuesta predominan las citoquinas IL-3, GM-CSF e IL-5, junto con mediadores lipídicos como prostaglandinas y leucotrienos, y otras citoquinas, que amplifican la respuesta inflamatoria (Murphy 2017).

### **III.1.1.1 Patogénesis del asma: rol de TNF- $\alpha$**

En el caso de las vías aéreas inferiores, el estadio más avanzado de hipersensibilidad es el desarrollo del asma. Se trata de un síndrome muy prevalente y complejo, caracterizado por la inflamación de los bronquios y la hipersensibilidad de las vías respiratorias (Boyce 2006). La remodelación de las vías aéreas se caracteriza por cambios estructurales, como hipertrofia del músculo liso, fibrosis subepitelial, hiperplasia de las células globulares y proliferación de los vasos sanguíneos y nervios de estas vías (Blacquiere 2010). Estas alteraciones son más comunes en pacientes con asma severo, mientras que la inflamación es el principal factor patogénico (Pepe 2005).

En cuanto a la inmunopatogénesis, ha sido observado que aún en los estadios más tempranos se observa una acumulación crónica de células inflamatorias (linfocitos, mastocitos, macrófagos) en la mucosa de las vías aéreas (Holgate 1992; Laitinen 1993), con un característico aumento de linfocitos T CD4 en las paredes de las vías respiratorias (Robinson 1993). En estos casos, tienen un importante rol las citoquinas IL-4, IL-13, IL-5 e IL-9 (Robinson 1993). IL-4 induce la degranulación de los mastocitos y, en conjunto con IL-13, la remodelación de las vías aéreas, la hiperreactividad broquial y la estimulación de la producción de mucus (Webb 2000; Wadsworth 2010). IL-9 induce la producción de mastocitos y de mucus (Kim 2013). Por su parte, IL-5 induce la producción de eosinófilos (Webb 2000; Hamelmann & Gelfand 2001). Adicionalmente, también se observó que la citoquina TNF- $\alpha$  secretada por los mastocitos es responsable de la expresión de moléculas de adhesión en pulmón (Chai 2011) y de la hiperreactividad de las vías aéreas (Kim 2007). A su vez, la quemoquina CCL2 también tendría un rol en esta patología, a través del



reclutamiento de macrófagos y células T a las vías aéreas (Lee 2015; Wang, A. 2015).

Adicionalmente, en pacientes con asma severo se ha observado un aumento en los niveles circulantes de las típicas citoquinas indicadoras de inflamación sistémica: TNF- $\alpha$  e IL-16, las cuales parecieran tener un rol fundamental en el aumento de la severidad de esta patología (Silvestri 2006). En particular se cree que TNF- $\alpha$  actúa como un amplificador de la inflamación local desarrollada durante el asma. Se ha observado que los niveles de TNF- $\alpha$  soluble son mayores en niños asmáticos (Najam 2001). Pero como no se trata de una de las clásicas citoquinas relacionadas con alergias, aún no se ha estudiado en profundidad el rol de TNF- $\alpha$  durante el desarrollo de esta patología.

### **III.1.1.2 Modelos murinos de asma bronquial**

Existen distintos modelos murinos que intentan reproducir las características del asma para su posterior estudio. Por un lado, en algunos se expresan o modifican genéticamente factores que contribuyen a su inmunopatogénesis como por ejemplo, la expresión de IL-5 o IL-13 en pulmón, la cual lleva al desarrollo de remodelación e inflamación de las vías aéreas (Lee 1997; Elias 2004). Por otro lado, los modelos mayormente utilizados son los de estimulación aguda o crónica a través de las vías aéreas con un alérgeno, como ovalbumina (OVA) o con ácaros del polvo doméstico (HDM, de sus siglas en inglés; (Lloyd 2007)). Los modelos más utilizados de inoculación de OVA realizan una inoculación repetida de este antígeno de forma crónica (hasta 12 semanas) en ratones, con una previa sensibilización a este antígeno. Este modelo induce las características principales de remodelación estructural e inflamación de las vías respiratorias (Shinagawa &

Kojima 2003). En línea con el aumento de TNF- $\alpha$  en vías respiratorias de pacientes, en este modelo animal se observó que el bloqueo de la respuesta a TNF- $\alpha$  (TNFR KO o por inoculación del receptor soluble) provoca una disminución en el número de eosinófilos en el líquido broncoalveolar, en la producción de IL-5 e IgE y en la remodelación estructural (fibrosis peribronquial y espesor del músculo liso) (Hutchison 2008; Malaviya 2017). Adicionalmente, en este modelo se observó que el TNF- $\alpha$  liberado por los mastocitos de las vías respiratorias promueve la inflamación e hiperreactividad de estas vías en el asma (Nakae 2007; Chai 2011).

Por lo tanto, se puede observar que, además de producirse un aumento de los niveles de las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13, existen evidencias de que TNF- $\alpha$  participa en la patogénesis del asma, al menos en los casos más severos. Sin embargo, al no tratarse de una las citoquinas clásicas de la respuesta a hipersensibilidad, y debido a resultados contradictorios en estudios con pacientes asmáticos (Matera 2010), aún no se conoce en profundidad el rol de esta citoquina en esta patología.

### **III.1.2 Ritmos circadianos en la función pulmonar**

Existen muchas patologías con un fuerte componente circadiano. Por ejemplo, los pacientes con artritis reumatoidea presentan mayores síntomas de dolor articular, rigidez e impedimentos funcionales temprano durante la mañana, lo cual correlaciona con un aumento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en suero y otros parámetros inmunes (Cutolo 2008). Otras patologías como las cardiovasculares, metabólicas y renales, entre otras, también poseen

fluctuaciones circadianas en sus síntomas (Martino & Young 2015; Johnston & Pollock 2018; Lemmer & Oster 2018).

En cuanto al asma bronquial, sus síntomas son más severos durante la noche en la mayoría de los pacientes. Fisiológicamente, la función pulmonar exhibe un ritmo circadiano, con un máximo durante la tarde (16hs), y un mínimo a la madrugada (4hs) (Silkoff & Martin 1998). En la mayoría de estos pacientes, esta variación es más pronunciada, y se ve acompañada por hipersensibilidad bronquial, inflamación de las vías respiratorias y una limitación más profunda del flujo de aire por la noche (Kraft 1996; Van Keimpema 1997; Jarjour 1999). Además, se han observado mayores niveles de linfocitos T CD4 y eosinófilos en las vías áreas de pacientes a las 4hs en comparación con las 16hs (Kelly 2004). Asimismo, en pacientes asmáticos, se encontraron alteraciones en los ritmos de secreción de las hormonas cortisol y melatonina (Fei 2004). Dichas características clínicas permiten separar a los pacientes en 2 grupos, que a su vez se asocian con la severidad de la patología: los que presentan asma nocturno y los que presentan síntomas diurnos, siendo los síntomas nocturnos más severos y los que podrían llevar a la mortalidad (Sutherland 2002; Sutherland 2003; Sutherland 2005). Pacientes con asma nocturno muestran mayores niveles de eosinófilos y macrófagos en fluido broncoalveolar durante la noche que individuos con asma no nocturno (Kraft 1996). Asimismo se observó que presentan mayores limitaciones respiratorias y una mayor disminución de la capacidad pulmonar (Sutherland 2005).

Adicionalmente, estos pacientes presentan dificultades para mantener el sueño, una baja calidad de sueño y somnolencia diurna (van Keimpema 1995). Estudios polisomnográficos en adolescentes y niños asmáticos revelaron un mayor

riesgo de desarrollar trastornos respiratorios relacionados con el sueño (por ejemplo, apneas) y alteraciones en la continuidad del sueño, con una mayor fragmentación de este parámetro (Stores 1998; Khassawneh 2019). Se observó que un mejor tratamiento de la patología puede generar mejorías en la calidad del sueño de estos sujetos (Stores 1998).

Como se puede observar, el sistema circadiano tiene un rol fundamental en la modulación de las funciones pulmonares y por lo tanto, en el desarrollo del asma. Pero aún se desconocen los mecanismos por los cuales los ritmos en la función respiratoria de los pacientes asmáticos son más pronunciados, exhibiendo una menor función pulmonar durante la madrugada. Esto además se ve acompañado de inflamación en las vías respiratorias, lo cual nos indica que el sistema inmune también participa de dicha interacción.

### **III.1.2.1 La interacción inmune-circadiana en el asma bronquial**

Como se mencionó en la sección anterior, los niveles de la hormona melatonina, fuertemente relacionada con el sistema circadiano, se alteran en los pacientes con asma. La estimulación con melatonina de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes asmáticos, extraídas a diferentes horarios, muestran un aumento en la secreción de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  en diferentes momentos del día en pacientes con patología nocturna, pero solo de noche en pacientes con la forma no nocturna (Sutherland 2002). Adicionalmente, en ratas pinealectomizadas (se extrae la glándula pineal, principal productora de melatonina), tratadas con OVA, se inhibe la migración de células inflamatorias al líquido broncoalveolar; pero si luego se las trata crónicamente con melatonina, esta migración celular se recupera (Martins 2001). El tratamiento *in vitro* de células

epiteliales de pulmón humano con TNF- $\alpha$  más melatonina, pero no con melatonina sola, induce la secreción de quimioattractantes, como RANTES y eotaxina, y el incremento de la quimiotaxis de eosinófilos; en forma dependiente de la dosis de melatonina (Luo 2004).

Adicionalmente, estudios recientes han demostrado una relación entre esta patología y el gen reloj Bmal1. La falta de este gen reloj exagera la respuesta inflamatoria de las vías respiratorias durante el asma, por lo que se considera que BMAL1 actuaría como un regulador negativo de esta patología. Asimismo, se observaron niveles alterados de genes reloj en muestras de pacientes asmáticos (Ehlers 2018).

Dado que, como se menciona previamente, el asma presenta una importante relación con el sistema circadiano, el modelo murino de asma bronquial resulta interesante a fin de estudiar el funcionamiento del sistema circadiano en el contexto de la inflamación crónica. Nuestra hipótesis es que la inflamación pulmonar crónica podría alterar el funcionamiento del reloj circadiano. Esta hipótesis se sustenta, además, en que el TNF- $\alpha$  juega un papel central en la inmunopatogénesis de esta patología y como se describe en el Capítulo 1 de esta tesis, es capaz de señalar al reloj central hipotalámico modulando sus variables de salida. Por lo tanto, en este apartado se estudiará la respuesta del sistema circadiano a la inflamación pulmonar crónica, a través del registro de actividad locomotora, y analizando si la inflamación es capaz de llegar a los NSQ.



## **III.2 MATERIALES Y**

## **METODOLOGÍA**





### **III.2.1 Animales y condiciones de alojamiento**

Se utilizaron los mismos animales y condiciones de alojamiento descritas en la sección I.2.1 del Capítulo 1.

#### **III.2.1.1 Registro de actividad locomotora**

Los animales se colocaron en jaulas plásticas individuales provistas de sensores de infrarrojo para la detección de actividad general. La actividad locomotora se registró mediante el sistema de adquisición de datos Archron® versión 2.1, diseñado en el Laboratorio de Cronobiología.

#### **III.2.1.2 Análisis de datos de actividad locomotora**

Se analizó el período endógeno de los animales utilizando periodogramas y la distribución de la actividad utilizando *waveforms*, tal como se indica en la sección I.2.2.1 del apartado de Materiales y Métodos del Capítulo 1.

Adicionalmente, se realizaron mapas de calor. Estos gráficos muestran el período instantáneo de máxima significancia a lo largo del tiempo, siendo los colores más cálidos (como el rojo) los que demuestran mayor significancia. También se analizó la variabilidad interdiaria (VI) y el índice de ritmicidad (IR). La VI se calcula como la relación de la media cuadrática de la primera derivada de los datos respecto de la varianza de la población de datos (Witting 1990). Un VI alto indica una fragmentación de los ritmos de actividad-reposo de los animales, indicando tanto episodios de reposo en la fase de actividad como

episodios de actividad en la fase de reposo. En cuanto al IR, indica cuán robusta es la ritmicidad de una oscilación, lo cual depende de la amplitud y de la regularidad de la señal que se está estudiando. Para su cálculo se realiza una autocorrelación de la señal, lo cual es un buen indicador de la amplitud a lo largo de todo el registro así como de su tasa de decaimiento. La autocorrelación es un análisis donde se realiza una correlación cruzada de una señal contra sí misma. Se inicia con las dos señales alineadas (es decir desde el mismo tiempo inicial) por lo que la correlación en ese punto es máxima (=1). Luego se va "moviendo" la señal a lo largo del tiempo. Si ésta posee algún patrón temporal que se repita se van a ver picos en la correlación cuando las señales estén en fase y valles cuando estén en antifase. Si no existen patrones temporales que se repitan la correlación de la señal contra si misma va a ser baja y sin picos. Para poder medir la intensidad de la ritmicidad se utiliza la altura del tercer pico del autocorrelograma (gráfico donde se representa la autocorrelación; (Levine 2002)).

Los algoritmos para estos análisis se programaron en nuestro laboratorio utilizando el software *MatLab*, lo cual forma parte del trabajo de Tesis del Dr. Carlos Caldart Valle.

### **III.2.2 Inducción de asma alérgico**

Los ratones fueron inoculados por vía ip 3 veces por semana con 30 µg de ovalbúmina (OVA; *Sigma Aldrich*) durante 2 semanas. Luego de 2 semanas de descanso, se les administró OVA por vía intranasal (100 µg/20µl) o nebulizado (1% de OVA en solución fisiológica), 3 veces por semana durante 3 o 6 semanas. El

nebulizado se realizó en una cámara de acrílico. En los casos en los cuales se utilizó adyuvante, la OVA se inyectó mezclada con 100 µl de una solución de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio (Imject Alum – Thermo Scientific). Como control se administró solución fisiológica.

En todos los casos para evitar una posible sincronización debido a la manipulación durante la estimulación, las inoculaciones se realizaron cada semana a horarios distintos (mañana-tarde-noche).

### **III.2.3 Análisis de la histopatología pulmonar**

Los animales fueron sacrificados en el punto final correspondiente y se extrajeron los pulmones, los cuales se colocaron en formalina. En dicha solución fueron enviados a un servicio de histopatología, donde se embebieron en parafina, cortó en secciones de 40-50 µm y se tiñó con hematoxilina y eosina; o con la técnica de ácido periódico de Schiff (PAS) para detección de mucus.

### **III.2.4 Determinación de los niveles de expresión de *Tnf-α* y *Ccl2***

#### **III.2.4.1 Extracción de ARN de tejido y retrotranscripción**

El tejido de pulmón y de NSQ fue procesado en 300 y 100 µl de *Trizol*®, respectivamente, y se realizó la retrotranscripción tal como se indica en la sección I.2.5.1 del apartado de Materiales y Métodos del Capítulo 1.

#### **III.2.4.2 PCR en Tiempo Real**

Con las muestras de ADNc provenientes del tejido de pulmón y NSQ, se realizó una *Real-Time* PCR utilizando el equipo SmartCycler II Thermal Cycler

Automated Real-Time PCR System (Cepheid) y la mezcla de reacción Master Mix qPCR (Productos BioLógicos, Argentina). Para la normalización se utilizó el gen HPRT. Los oligonucleótidos utilizados fueron: HPRT-F 5'- TGT TGG ATA CAG GCC AGA C-3', HPRT-R 5' TGG CAA CAT CAA CAG GAC TC-3', TNF-F 5'-GAC AGT GAC CTG GAC TGT GG-3', TNF-R 5'-GAG ACA GAG GCA ACC TGA CC-3', CCL2-F-5'- CGG CTG GAG CAT CCA CGT GTT-3', y CCL2-R-5'- TGG GGT CAG CAC AGA CCT CTC-3'.

Para el análisis de la expresión relativa se utilizó el método del  $\Delta\Delta C_t$ .

## **III.3 RESULTADOS**



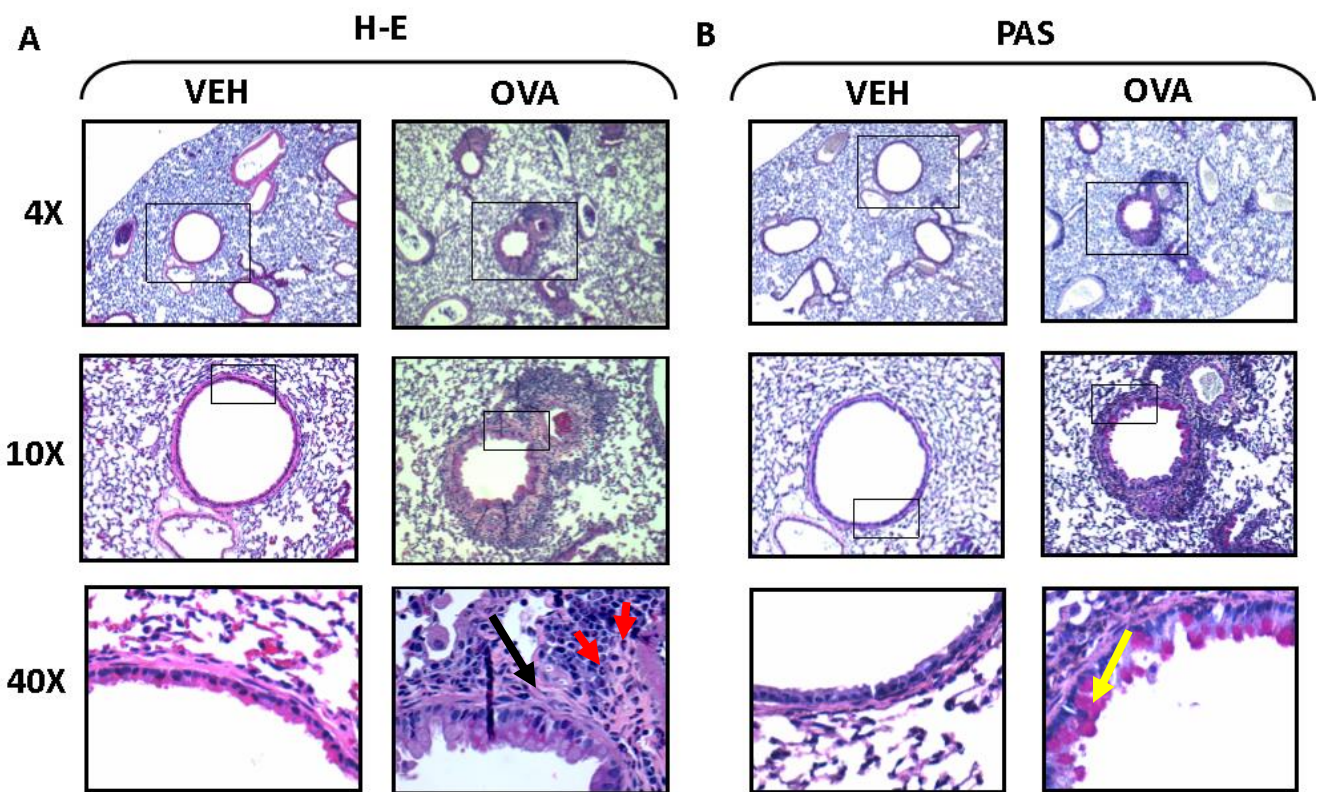
### **III.3.1 Confirmación del desarrollo de la patología**

Para el desarrollo del modelo de asma bronquial, se sometió a los ratones a un protocolo de inducción de inflamación crónica de las vías respiratorias. Como primer paso, se puso a punto la dosis de OVA a inocular tanto por vía ip como por vía intranasal. Además, se analizó si era conveniente utilizar un adyuvante para la sensibilización ip y si la etapa de inducción alérgica era mejor realizarla por medio de repetidas inyecciones intranasales o por medio de nebulizaciones. A través de estos análisis se concluyó que la administración de OVA sin adyuvante por vía ip y las siguientes inoculaciones por vía intranasal induce las características inmunopatológicas deseadas. El protocolo elegido consistió en la inoculación repetida de OVA por vía intranasal durante 3 y 6 semanas, luego de una previa sensibilización al alérgeno por vía ip (sin adyuvante; comenzando 1 mes antes: 15 días de inoculación ip y 15 días de descanso antes de la inoculación intranasal) como se describe en la sección III.2.2 del presente anexo.

#### **III.3.1.1 Histopatología de los pulmones**

Utilizando el mencionado protocolo se estudió el fenotipo histopatológico característico al modelo murino de asma bronquial, en todos los protocolos realizados. En este caso se muestran las imágenes histopatológicas del protocolo elegido, el cual presentó características más severas que el protocolo nebulizado, y similares al protocolo en el cual las inyecciones de sensibilización se realizaron con adyuvante.

Las tinciones de Hematoxilina-Eosina y PAS demostraron un aumento en la fibrosis del tejido pulmonar (flecha negra en la Figura III.1), en la infiltración de células inmunes (flechas rojas de la Figura III.1) y en la acumulación de mucus (observable como “gotas” de color fucsia en la tinción de PAS; flecha amarilla de la Figura III.1); así también, se observó hipertrofia e hiperplasia del epitelio pulmonar (Figura III.1).

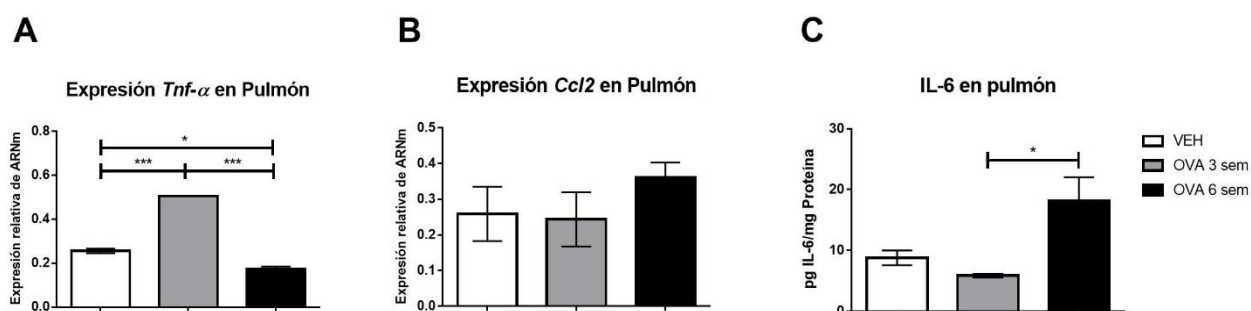


**Figura III.1** Histopatología de cortes de pulmón provenientes de ratones a los cuales se sometió al modelo de asma bronquial murino. Se realizó una tinción de hematoxilina y eosina (A) para poder visualizar la fibrosis e infiltrado pulmonar, y de PAS (B) para observar la presencia de mucus, en los pulmones de ratones sometidos al protocolo de administración de OVA intranasal durante 6 semanas, posterior a la sensibilización por vía ip. Los recuadros indican las áreas que fueron ampliadas en las imágenes que se muestran debajo para una mejor visualización del epitelio pulmonar y del infiltrado. La flecha negra señala la fibrosis pulmonar, las rojas el infiltrado, y la amarilla el mucus.



### III.3.1.2 Niveles de expresión de *Tnf-α* y *Ccl2*, y de IL-6 en pulmón

Adicionalmente, se evaluaron los niveles de ARNm de la citoquina *Tnf-α* y de la quemoquina *Ccl2*, y los niveles de IL-6, en pulmón luego de la inoculación de OVA intranasal durante 3 y 6 semanas. Se confirmó que los niveles de mRNA de la citoquina *Tnf-α*, y los niveles de proteína de la citoquina IL-6, aumentaron en pulmón (Figura III.2,  $p=0.0248$  y  $p<0.0001$ , respectivamente), 3 y 6 semanas luego de comenzar con la inoculación intranasal, respectivamente. En cambio, los niveles de *Ccl2* no resultaron distintos entre los grupos de animales analizados. También se tomaron muestras de suero, pero no fue posible detectar la presencia de citoquinas en él a ninguno de los tiempos estudiados.

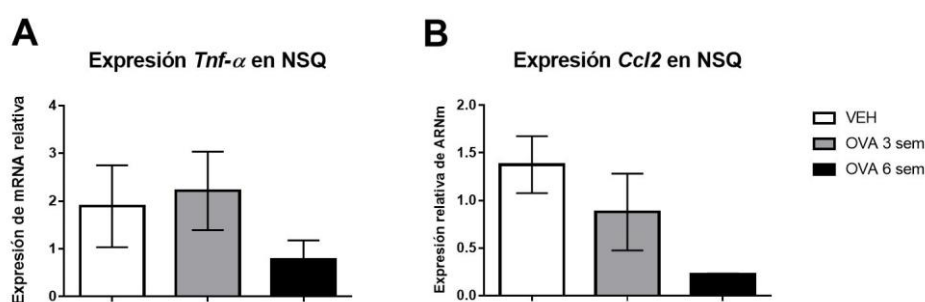


**Figura III.2. Expresión de citoquinas pro-inflamatorias en tejido pulmonar de animales tratados con OVA o VEH por vía intranasal durante 3 o 6 semanas.** Niveles de ARNm de *Tnf-α* (A) y *Ccl2* (B) y de proteína de IL-6 en pulmón (C). ANOVA de una vía A)  $p=0.0248$  y C)  $p<0.0001$ , seguido de Test de Bonferroni: A)  $p=0.0002$  para OVA 3 sem vs VEH,  $p=0.0124$  para OVA 6 sem vs VEH,  $p<0.0001$  para OVA 3 sem vs OVA 6 sem; C)  $p=0.0319$  para OVA 3 sem vs OVA 6 sem. ( $n=3$  para cada grupo)

### III.3. 2 Expresión de citoquinas en NSQ en animales con asma bronquial

Una de nuestras hipótesis era que a través de este modelo se iban a inducir citoquinas pro-inflamatorias, especialmente TNF- $\alpha$ , crónicamente en NSQ y, por lo tanto, se deseaba estudiar si esto afectaría la normal actividad del

reloj circadiano. Por lo tanto, 3 y 6 semanas luego de la inoculación intranasal con OVA se extrajo el cerebro y, a continuación, el tejido correspondiente a los NSQ, y se analizaron los niveles de expresión de la citoquina *Tnf- $\alpha$*  y de la quemoquina *Ccl2*. Como se observa en la Figura III.3, luego del protocolo no se modificó significativamente la expresión de ninguna de estas dos moléculas en NSQ a los tiempos estudiados.



**Figura III.3. Expresión de *Tnf- $\alpha$*  y *Ccl2* en NSQ de animales tratados con OVA intranasal o VEH por 3 o 6 semanas.** Niveles de ARNm de *Tnf- $\alpha$*  (A) y *Ccl2* (B) en NSQ. (n=3 para VEH y OVA 3 sem, n=2 para OVA 6 sem).

### III.3.3 Caracterización de la actividad locomotora general de animales sometidos al asma bronquial

Una vez confirmado el fenotipo patogénico, se realizó el análisis de los registros de actividad locomotora general. Previo a la inducción del asma, los animales fueron mantenidos en condiciones de LO12:12 a fin de corroborar que sus patrones de actividad se encontraran sincronizados al mismo. Posteriormente, se los dejó en condiciones de oscuridad constante (libre curso) en las cuales es posible analizar el funcionamiento del sistema circadiano como se explica en la sección 1.4 de la Introducción general. En estas condiciones se

realizó la inducción del asma alérgico, utilizando el protocolo de inoculación de OVA intranasal durante 6 semanas, y se evaluó el ritmo de actividad general en las diferentes etapas del mismo: sensibilización (S), reposo (R), y primer (I 1), segundo (I 2) y tercer período (I 3) de inoculación intranasal. Cada período I1, I2 y I3, corresponde a 15 días del período de inoculación intranasal.

A partir de los datos obtenidos, se analizaron distintos parámetros del ritmo de actividad de los animales sometidos al protocolo de inducción de asma bronquial en comparación con los controles inoculados con VEH. En la figura Figura III.4 A se muestran actogramas y mapas de calor representativos. Como se explica en la sección III.2.1.2 de este capítulo, los mapas de calor muestran el período instantáneo de máxima significancia a lo largo del tiempo. En el eje X se grafican períodos posibles, mientras que en el eje Y los días sucesivos. Los colores más cálidos indican mayor significancia, siendo el rojo el más significativo. Si se observan los mapas de calor de los animales inoculados con OVA, estos muestran una inestabilidad en el período, ya que a medida que se avanza en el protocolo, comienzan a aparecer distintos períodos significativos (en rojo) diferentes a 24 horas, mientras que se va perdiendo la significancia del período principal (cercano a 24h).

Adicionalmente, se analizó el período en libre curso en cada una de las etapas del protocolo utilizando periodogramas como se explica en la sección 1.4.2. Como se muestra en la Figura III.4 B, el período cercano a las 24h, no se modifica durante el protocolo. Esto nos indica que el componente de 24h se mantiene a lo largo del protocolo, pero como se observa en el mapa de calor, emergen otros posibles períodos que podrían ser significativos.

Por último se analizó la cantidad y distribución de la actividad durante el día circadiano utilizando waveforms, como se explica en la sección 1.4.2. En la Figura III.4 C-E se puede observar que, el  $\alpha$  (duración de la noche subjetiva), la relación  $\alpha/\rho$  y el porcentaje de actividad nocturna no difieren entre animales con asma bronquial y los controles.

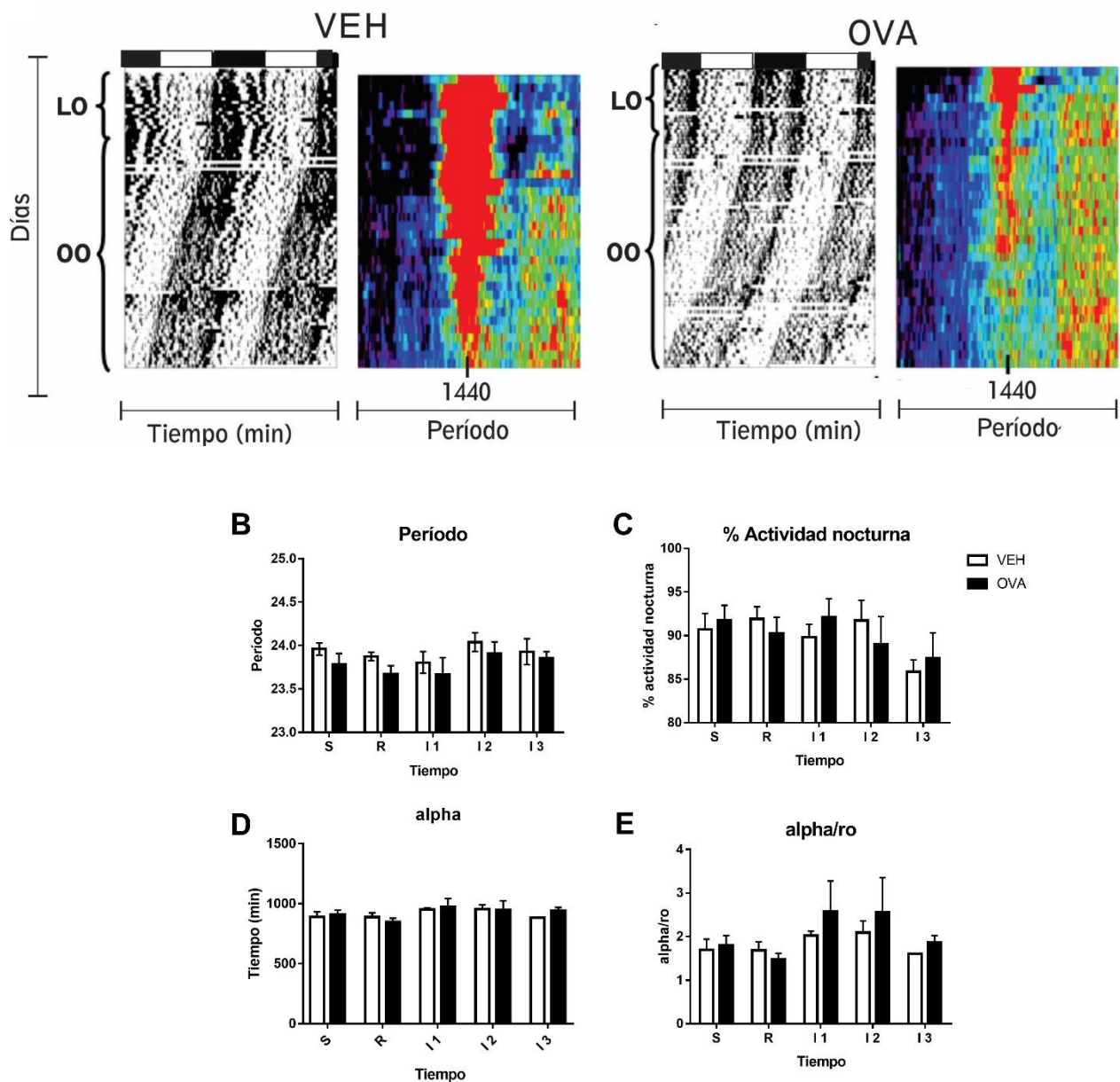
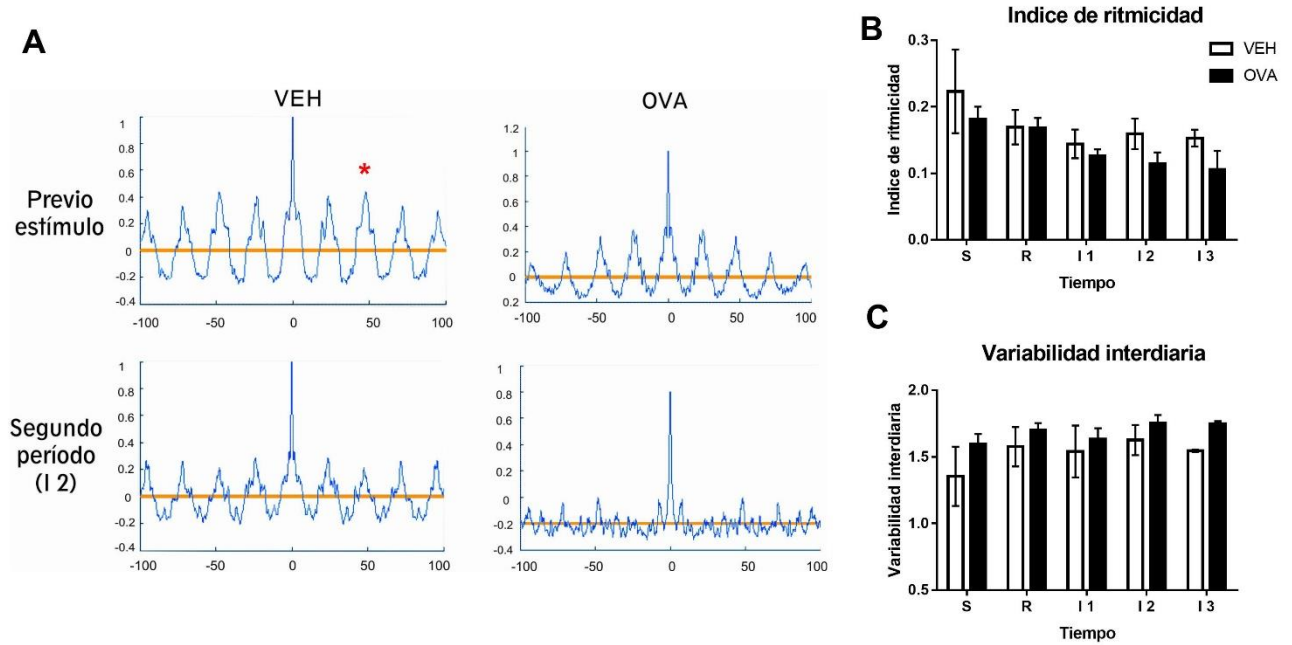


Figura III.4. Ver leyenda en la próxima página.

**Figura III.4. Caracterización circadiana de los animales sometidos al protocolo de inflamación pulmonar crónica.** A) Actogramas representativos (a la izquierda) mostrando la actividad locomotora general durante el protocolo de inducción de asma bronquial, registrada con un sensor de infrarrojo en condiciones de luz-oscuridad (LO) y oscuridad constante (OO), y los mapas de calor (a la derecha) correspondientes al mismo registro de actividad mostrando en rojo los períodos más significativos, en LO u OO, a lo largo de los días. Media  $\pm$  SEM B) del período de actividad, C) porcentaje de actividad durante la noche subjetiva, D) de la duración de la noche subjetiva en minutos ( $\alpha$ ), y E) del cociente entre  $\alpha$  y la duración del día subjetivo ( $\rho$ ), en los períodos de sensibilización (S), reposo (R), y primer (I 1), segundo (I 2) y tercer período (I 3) de inoculación intranasal en OO. Cada período corresponde a 15 días. (n= 6 OVA, n=4 VEH, excepto para I 3: n=3 OVA, VEH n=2.

A continuación, se estudió la variabilidad interdiaria y el índice de ritmicidad. Como se explica en la sección III.2.1.2, la VI se relaciona con la fragmentación de los ritmos de actividad-reposo de los animales. Por su parte el IR, indica cuán robusta es la ritmicidad de una oscilación (Witting 1990; Lahti 2006). Para calcular el IR se utilizan autocorrelaciones de la actividad de cada día con el siguiente, y así sucesivamente. Si existe algún patrón temporal que se repita se van a ver picos en la correlación (ver en detalle sección III.2.1.2). En la Figura III.5 A se muestran las autocorrelaciones de los animales en el período de oscuridad constante previo a la administración de OVA, y en el segundo período de inoculaciones intranasales. Como se observa previo al estímulo ambos animales (tratados y controles) presentan picos sobre la línea de significancia, demostrando la existencia de patrones rítmicos en la actividad. En cambio en el segundo período de inoculaciones intranasales, los animales tratados con OVA pierden estos picos significativos y la señal baja, a diferencia de los controles. Esto indica una pérdida en la robustez del ritmo de actividad locomotora. Como se muestra en la Figura III.5 B, se observó que los ratones inoculados con OVA poseen una tendencia a disminuir el IR de la actividad e incrementar la VI, hacia el final del protocolo de inoculación de OVA,

especialmente en el último período (I 3). Esto nos indica que podría existir una mayor fragmentación del ciclo de sueño-reposo en estos animales.



**Figura III.4. Índice de ritmicidad y variabilidad interdiaria de la actividad locomotora de ratones inoculados con OVA o VEH.** A) Autocorrelaciones de la actividad diaria de ratones estimulados con OVA o VEH. Media  $\pm$  EEM de B) el índice de ritmicidad y C) la variabilidad interdiaria. La estrella roja sobre las autocorrelaciones indica el pico que se utilizó para el análisis (n= 6 OVA, n=4 VEH, excepto para I 3: n=3 OVA, VEH n=2).

## **III.4 DISCUSIÓN**





### **III.4.1 Desarrollo de la patología**

En este caso se utilizó un modelo de asma bronquial, inducido por la inflamación crónica de las vías respiratorias, generado por la repetida inoculación de OVA por vía intranasal durante 6 semanas. Nuestro principal objetivo fue estudiar si la inflamación crónica era capaz de llegar a los NSQ y alterar el funcionamiento del reloj circadiano de los animales. Se utilizó este modelo debido a que existen evidencias de que  $TNF-\alpha$ , citoquina de interés en el desarrollo de este trabajo de tesis, posee un rol importante en su inmunopatogénesis.

A través de los estudios de la histopatología en pulmón, se pudo confirmar que el desarrollo del modelo fue efectivo, ya que se observaron las características principales de remodelación de las vías respiratorias: aumento en la fibrosis del tejido pulmonar, infiltración de células inmunes y la acumulación de mucus; como así también se observó, hipertrofia e hiperplasia del epitelio pulmonar. Adicionalmente, se estudiaron características inflamatorias (evidenciado por el aumento de infiltrado en tejido) y se demostró un aumento en la expresión de la citoquina *Tnf- $\alpha$* , y en los niveles de IL-6, en tejido de pulmón.

### **III.4.2 Niveles de mediadores inflamatorios en NSQ**

Como se explicó anteriormente, nuestra hipótesis era que los niveles de citoquinas aumentarían en NSQ en respuesta a la inflamación crónica periférica. En los Capítulos 1 y 2 de esta tesis, se demostró que  $TNF\alpha$  podría actuar como mediador de la comunicación inmune-circadiana a nivel central. Numerosos

estudios también demostraron su rol en la patogénesis del asma (sección III.1.1). Adicionalmente, resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la quemoquina CCL2 participa en la respuesta circadiana al LPS periférico y que la expresión de su receptor se induce en NSQ en respuesta a un estímulo inmune periférico (Duhart 2016). Asimismo, en este trabajo demostramos la inducción de la quemoquina en esta región después de la inoculación con LPS (sección I.3.2.1). Por estas razones se postula también a CCL2 como un posible mediador de la interacción inmune-circadiana. Por otra parte, se ha evidenciado un aumento de los niveles de esta quemoquina en los pulmones y vías aéreas en modelos animales de asma, la cual se encargaría de reclutar macrófagos y células T a las vías aéreas (Lee 2015; Wang, A. 2015).

A partir de todas estas evidencias se estudiaron los niveles de *Tnf- $\alpha$*  y *Ccl2* en NSQ, pero no se observaron cambios significativos. Esto indica que la señal inflamatoria desencadenada en la periferia no induce la expresión de estas moléculas en los NSQ, al menos en los tiempos estudiados y con el protocolo utilizado. Una posible hipótesis es que las citoquinas/quemoquinas estén llegando directamente al cerebro desde la periferia a través de la BHE o de los órganos circumventriculares o señalizando a través del nervio vago, como se explica en la sección 3.1.2 de la Introducción general, y por lo tanto no se expresen en los NSQ. Otra posibilidad es que la señal inmune periférica induzca la expresión de citoquinas/quemoquinas en otras regiones del SNC y éstas pueden señalizar a los NSQ a través de vías nerviosas específicas, funcionando como vías de entrada de estos núcleos.

Otros grupos han encontrado respuesta inflamatoria en el SNC en respuesta a la inflamación de las vías respiratorias. Por ejemplo, se ha

observado que en un modelo de asma similar al utilizado en este trabajo, hay un incremento de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y se induce activación de la microglía en hipocampo y corteza prefrontal (Xia 2014). Otros estudios demostraron un aumento en la expresión de cFos, GFAP y de la enzima óxido nítrico sintasa en hipocampo en respuesta a la estimulación periférica con OVA (Chen 2008). Adicionalmente, se conoce que los pulmones están innervados por neuronas sensoriales y parasimpáticas que pueden llevar a cabo esta interacción bidireccional (Nassenstein 2018).

### **III.4.3 Análisis del patrón de actividad circadiana**

Mediante el estudio de actividad general de los ratones sometidos a este protocolo, observamos una tendencia al aumento de la variabilidad interdiaria, y la disminución del índice de ritmicidad, en los últimos períodos del protocolo. Estos son parámetros que se utilizan generalmente para estudiar alteraciones del ciclo de sueño-vigilia, e indican cuán fragmentada se encuentra la actividad durante las 24h del día o cuán consolidada está a la fase de actividad (Witting 1990; Lahti 2006). Por lo tanto, el análisis de ambos parámetros en conjunto nos estaría indicando que estos animales con asma bronquial presentan un ciclo de actividad-reposo menos consolidado que los controles, y que están teniendo episodios de actividad durante la fase de reposo. Estos resultados se correlacionan con las observaciones en pacientes asmáticos, los cuales suelen presentar una baja calidad y fragmentación del sueño (van Keimpema 1995; Meltzer & Pugliese 2017). Adicionalmente, estos pacientes han demostrado un mayor riesgo de desarrollar

trastornos respiratorios relacionados con el sueño, en adolescentes y niños asmáticos (Stores 1998; Khassawneh 2019).

Por último, estos animales no presentaron diferencias en los parámetros de actividad que se estudian clásicamente, como el período, el porcentaje de actividad nocturna y duración de la noche subjetiva.

A pesar de haber detectado modificaciones del ritmo de actividad, con este modelo no obtuvimos los resultados esperados en cuanto a la inducción de TNF- $\alpha$  y CCL2 en los NSQ, los cuales podrían alterar al funcionamiento del reloj circadiano en forma significativa. Dichas alteraciones podrían ser inducidas por vías diferentes a las estudiadas. En este punto, se debería profundizar en el estudio de otros modelos, o realizar este mismo protocolo durante un período más prolongado de tiempo para analizar si de esta forma se logra obtener un estado inflamatorio crónico capaz de alterar de forma significativa al sistema circadiano, dado que han sido reportados protocolos similares con una duración de hasta 12 semanas que muestran como incrementa el daño tisular y la inflamación en pulmón. En estos protocolos se observa que se incrementa la remodelación del tejido pulmonar, junto con la infiltración celular, llevando a la inflamación de las vías aéreas (Wegmann & Renz 2005; Van Hove 2009). Asimismo, esta hipótesis se sustenta también en que hacia el final del protocolo utilizado en este trabajo se comenzaron a observar modificaciones circadianas. Adicionalmente, se podrían estudiar otras vías de señalización dado que los niveles de TNF- $\alpha$  en pulmón descienden a las 6 semanas de inoculación. De esta forma se podría tener mayor información acerca del comportamiento del reloj circadiano durante la inflamación crónica, ya que al día de hoy se conoce muy poco al respecto.

# **CONCLUSIONES GENERALES**



En la presente tesis se estudió la interacción bidireccional entre el sistema inmune y el circadiano, poniendo especial énfasis en el rol de la citoquina TNF- $\alpha$  en esta comunicación. En relación a la modulación del sistema circadiano por parte del sistema inmune, se utilizó en una primera instancia un modelo de inflamación aguda con dosis bajas de LPS, el cual se había demostrado que era capaz de inducir alteraciones sobre el reloj circadiano, estudiando de esta forma cómo el sistema inmune puede alterar su funcionamiento. Este modelo no puede considerarse patológico, ya que las dosis de LPS utilizadas son muy bajas, y no son capaces de generar una respuesta inflamatoria significativa. Posteriormente, se evaluó un modelo de inflamación crónica como lo es el asma bronquial, el cual, hasta el momento, no había sido estudiado desde el punto de vista circadiano.

En el otro sentido de la interacción, se utilizó un modelo de inflamación aguda pero en este caso con dosis altas de LPS capaces de inducir sepsis. Este modelo fue elegido dado que desencadena una respuesta diferente en el organismo de acuerdo al horario en el que el LPS es administrado. A través de este modelo, se deseaba analizar en mayor profundidad cómo el reloj circadiano es capaz de modular la respuesta a un estímulo inmune.

Nuestros resultados apuntan a una participación importante de la citoquina TNF- $\alpha$  en la comunicación bidireccional entre ambos sistemas. En primer lugar, como se demostró en el Capítulo 1, sumado a datos bibliográficos, ante la estimulación inmune aguda leve, la vía de señalización mediada por TNF- $\alpha$  y su receptor TNFR1 es clave para modular la función del reloj central ubicado en los NSQ. En este sentido, un aporte clave de este trabajo es que la dependencia horaria de la respuesta circadiana a dicho estímulo (dado que solo

produce cambio de fase si se administra durante la noche temprana) podría depender de la expresión rítmica del receptor TNFR1 en los NSQ.

En cuanto al modelo crónico presentado en el Anexo I, pudimos observar algunas modificaciones de los ritmos de actividad locomotora inducidas por la inflamación pulmonar (utilizando un modelo de asma bronquial).

Por otro lado, en el modelo patológico de shock séptico, estudiado en el Capítulo 2, se demostró que, además de existir una variación diaria en la mortalidad inducida por dosis altas de LPS, también se desarrolla una respuesta hipotérmica diferencial, acompañada por una mayor activación neuronal de APO, NSQ y NPV en respuesta al LPS administrado al final del día. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la respuesta hipotérmica diferencial estaría provocada por un factor presente en el suero de los animales sépticos, y que la diferencia horaria en la severidad podría depender de una respuesta inmune pro-inflamatoria más agresiva desarrollada en dicho horario. En relación con esto se observó que los niveles de TNF- $\alpha$  en suero son mayores cuando la patología se desencadena al final del día. Adicionalmente, se demostró que la señalización por TNFR1 participa de la respuesta séptica tanto influyendo en la supervivencia como en la respuesta termoregulatoria, y que sería responsable de la dependencia horaria observada. Por último, la importancia de una correcta sincronización del sistema circadiano en la determinación de la severidad del proceso séptico, queda en evidencia al observar que la desincronización circadiana crónica exacerba la respuesta a las dosis altas de LPS.

Los resultados presentados en este trabajo de tesis aportan datos relevantes acerca de la comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el circadiano. En el primer caso (capítulo 1 y anexo I), esta interacción podría ser



necesaria para que el sistema circadiano “conozca” el estado del sistema inmune, y pueda realizar un ajuste más fino de su mecanismo molecular a través de diferentes variables que señalizan a la región de *Shell* de los NSQ como se describe en la introducción general. Una vez ajustado, este mecanismo podría regular mejor a los relojes periféricos, adaptándolos a las situaciones a las cuales puedan estar expuestos los diferentes órganos y tejidos. De este modo, el LPS, a través de la inducción de citoquinas en periferia, podría actuar como un sincronizador de los ritmos inmunes (compartiendo vías con la sincronización fótica), formando parte de un mecanismo de retroalimentación que el sistema circadiano utiliza para ajustar la fase del oscilador central.

En el modelo utilizado en el Capítulo 2, se estudió cómo el sistema circadiano es capaz de generar ritmos en distintas variables, como las inmunes, debido a lo cual el organismo responde de manera diferencial ante el mismo estímulo administrado en distintos momentos del día. Dado que la sola modificación del horario de administración del LPS genera una diferencia importante en la sobrevivencia de los animales, el conocimiento en mayor profundidad de este modelo podría ser de utilidad para comprender los mecanismos que determinan la muerte por shock séptico y por lo tanto, los mecanismos que pueden desencadenar la muerte de un paciente, y los que pueden protegerlo. De esta forma se podrían encontrar posibles blancos terapéuticos, a través de la inhibición de los mecanismos que llevan a la muerte o la estimulación de aquellos que facilitan la sobrevivencia.

Por otro lado, si logramos entender mejor la comunicación entre ambos sistemas, podríamos comprender la etiología de ciertas patologías, como la del asma nocturno (descrito en el anexo de este trabajo, (Sutherland 2005)) o la

artritis reumatoidea, en la cual se observaron alteraciones en los ritmos circadianos de secreción de ciertas hormonas y factores inmunes (Kouri 2013). Como así también, comprender las alteraciones inmunes que ocurren durante la desincronización circadiana. Por ejemplo, el mayor desarrollo de hipotiroidismo autoinmune observado en trabajadores en turnos rotativos (Magrini 2006), o el agravamiento de los síntomas de las enfermedades gastrointestinales inflamatorias (Enfermedad de Crohn y Colitis ulcerativa), observado en condiciones de disrupción circadiana (Swanson & Burgess 2017).

El objetivo general de este trabajo fue estudiar el rol de TNF- $\alpha$  en la comunicación inmune-circadiana. A través de los resultados obtenidos podemos afirmar que esta citoquina tiene un rol fundamental como mediador de esta comunicación, en ambas condiciones.

## **ABREVIATURAS**

**ADNc:** ácido desoxiribonucleico copia

**APO:** área preóptica

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**BHE:** barrera hematoencefálica

**CCL2:** proteína quimiotáctica de monocitos 1

**CRF:** curva de respuesta de fase

**CT:** hora circadiana

**HPA:** hipófisis-pituitaria-adrenal

**icv:** intracerebroventricular

**IL:** interleuquina

**IL-R:** receptor de interleuquina

**in:** intranasal

**ip:** intraperitoneal

**JLC:** *jet-lag* crónico

**LL:** luz constante

**LO:** luz-oscuridad

**LPS:** lipopolisacárido bacteriano

**NPV:** núcleos paraventriculares

**NSQ:** núcleos supraquiasmáticos

**OO:** oscuridad constante

**OVA:** ovalbúmina

**PAMPs:** patrones moleculares asociados a patógenos

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**RRP:** receptor de reconocimiento de patrones

**SNC:** sistema nervioso central

**TLR:** receptor de tipo Toll

**TNF:** factor de necrosis tumoral

**TNFR:** receptor para TNF

**ZT:** hora del *zeitgeber*

# BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., S. Honma, et al. (1998). "Circadian rhythm and light responsiveness of BMAL1 expression, a partner of mammalian clock gene Clock, in the suprachiasmatic nucleus of rats." Neurosci Lett **258**(2): 93-96.
- Abo, T., T. Kawate, et al. (1981). "Studies on the bioperiodicity of the immune response. I. Circadian rhythms of human T, B, and K cell traffic in the peripheral blood." J Immunol **126**(4): 1360-1363.
- Abrahamson, E. E. and R. Y. Moore (2001). "Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections." Brain Res **916**(1-2): 172-191.
- Adams, K. L., O. Castanon-Cervantes, et al. (2013). "Environmental circadian disruption elevates the IL-6 response to lipopolysaccharide in blood." J Biol Rhythms **28**(4): 272-277.
- Aderka, D. (1991). "Role of tumor necrosis factor in the pathogenesis of intravascular coagulopathy of sepsis: potential new therapeutic implications." Isr J Med Sci **27**(1): 52-60.
- Akashi, M., Y. Tsuchiya, et al. (2002). "Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells." Mol Cell Biol **22**(6): 1693-1703.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Al-Naimi, S., S. M. Hampton, et al. (2004). "Postprandial metabolic profiles following meals and snacks eaten during simulated night and day shift work." Chronobiol Int **21**(6): 937-947.
- Alexander, C. and E. T. Rietschel (2001). "Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity." J Endotoxin Res **7**(3): 167-202.
- Almeida, M. C., A. A. Steiner, et al. (2006). "Neural substrate of cold-seeking behavior in endotoxin shock." PLoS One **1**: e1.
- Almutairi, M. M., C. Gong, et al. (2016). "Factors controlling permeability of the blood-brain barrier." Cell Mol Life Sci **73**(1): 57-77.
- Andersson, U. and K. J. Tracey (2012). "Neural reflexes in inflammation and immunity." J Exp Med **209**(6): 1057-1068.
- Angus, D. C. and T. van der Poll (2013). "Severe sepsis and septic shock." N Engl J Med **369**(9): 840-851.
- Annane, D., E. Bellissant, et al. (2009). "Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review." JAMA **301**(22): 2362-2375.
- Arendt, J. and V. Marks (1982). "Physiological changes underlying jet lag." Br Med J (Clin Res Ed) **284**(6310): 144-146.
- Arjona, A. and D. K. Sarkar (2006). "Evidence supporting a circadian control of natural killer cell function." Brain Behav Immun **20**(5): 469-476.
- Asai, M., Y. Yoshinobu, et al. (2001). "Circadian profile of Per gene mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus, paraventricular nucleus, and pineal body of aged rats." J Neurosci Res **66**(6): 1133-1139.
- Aschoff, J. (1965). "Circadian Rhythms in Man." Science **148**(3676): 1427-1432.

- Ashkenazi, A., S. A. Marsters, et al. (1991). "Protection against endotoxic shock by a tumor necrosis factor receptor immunoadhesin." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10535-10539.
- Ayala, A., Z. K. Deol, et al. (1995). "Does endotoxin play a major role in inducing the depression of macrophage function during polymicrobial sepsis?" Arch Surg **130**(11): 1178-1184; discussion 1184-1175.
- Ayroldi, E., L. Cannarile, et al. (2012). "Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways." FASEB J **26**(12): 4805-4820.
- Balsalobre, A., S. A. Brown, et al. (2000). "Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling." Science **289**(5488): 2344-2347.
- Balsalobre, A., F. Damiola, et al. (1998). "A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells." Cell **93**(6): 929-937.
- Ballabh, P., A. Braun, et al. (2004). "The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications." Neurobiol Dis **16**(1): 1-13.
- Beaule, C. and S. Amir (1999). "Photic entrainment and induction of immediate-early genes within the rat circadian system." Brain Res **821**(1): 95-100.
- Becskei, C., T. Riediger, et al. (2008). "Inhibitory effects of lipopolysaccharide on hypothalamic nuclei implicated in the control of food intake." Brain Behav Immun **22**(1): 56-64.
- Belevych, N., K. Buchanan, et al. (2010). "Location-specific activation of the paraventricular nucleus of the hypothalamus by localized inflammation." Brain Behav Immun **24**(7): 1137-1147.
- Bellet, M. M., E. Deriu, et al. (2013). "Circadian clock regulates the host response to Salmonella." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(24): 9897-9902.
- Ben-Eliyahu, S., G. G. Page, et al. (1999). "Evidence that stress and surgical interventions promote tumor development by suppressing natural killer cell activity." Int J Cancer **80**(6): 880-888.
- Beniashvili, D. S., S. Benjamin, et al. (2001). "Effect of light/dark regimen on N-nitrosoethylurea-induced transplacental carcinogenesis in rats." Cancer Lett **163**(1): 51-57.
- Benstaali, C., A. Mailloux, et al. (2001). "Circadian rhythms of body temperature and motor activity in rodents their relationships with the light-dark cycle." Life Sci **68**(24): 2645-2656.
- Bernik, T. R., S. G. Friedman, et al. (2002). "Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway." J Exp Med **195**(6): 781-788.
- Beynon, A. L. and A. N. Coogan (2010). "Diurnal, age, and immune regulation of interleukin-1beta and interleukin-1 type 1 receptor in the mouse suprachiasmatic nucleus." Chronobiol Int **27**(8): 1546-1563.
- Bibby, D. C. and R. F. Grimble (1989). "Temperature and metabolic changes in rats after various doses of tumour necrosis factor alpha." J Physiol **410**: 367-380.
- Bienkowski, M. S. and L. Rinaman (2008). "Noradrenergic inputs to the paraventricular hypothalamus contribute to hypothalamic-pituitary-adrenal axis and central Fos activation in rats after acute systemic endotoxin exposure." Neuroscience **156**(4): 1093-1102.
- Blacquiere, M. J., M. N. Hylkema, et al. (2010). "Airway inflammation and remodeling in two mouse models of asthma: comparison of males and females." Int Arch Allergy Immunol **153**(2): 173-181.

- Bohatschek, M., A. Werner, et al. (2001). "Systemic LPS injection leads to granulocyte influx into normal and injured brain: effects of ICAM-1 deficiency." Exp Neurol **172**(1): 137-152.
- Boivin, D. B., F. O. James, et al. (2003). "Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells." Blood **102**(12): 4143-4145.
- Bollinger, T., A. Bollinger, et al. (2010). "Sleep, immunity, and circadian clocks: a mechanistic model." Gerontology **56**(6): 574-580.
- Bonaz, B., V. Sinniger, et al. (2017). "The Vagus Nerve in the Neuro-Immune Axis: Implications in the Pathology of the Gastrointestinal Tract." Front Immunol **8**: 1452.
- Bonilla, F. A. and H. C. Oettgen (2010). "Adaptive immunity." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S33-40.
- Boomer, J. S., K. To, et al. (2011). "Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure." JAMA **306**(23): 2594-2605.
- Borghini, A., L. Verstrepen, et al. (2016). "TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF-kappaB, MAP kinases and cell death." Biochem Pharmacol **116**: 1-10.
- Born, J., T. Lange, et al. (1997). "Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells." J Immunol **158**(9): 4454-4464.
- Borovikova, L. V., S. Ivanova, et al. (2000). "Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation." Auton Neurosci **85**(1-3): 141-147.
- Bosman, W. M., B. L. Borger van der Burg, et al. (2014). "Infections of intravascular bare metal stents: a case report and review of literature." Eur J Vasc Endovasc Surg **47**(1): 87-99.
- Botchkina, G. I., M. E. Meistrell, 3rd, et al. (1997). "Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia." Mol Med **3**(11): 765-781.
- Boulant, J. A. (1998). "Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature." Ann N Y Acad Sci **856**: 108-115.
- Boyce, J. A. (2006). "Asthma 2005-2006: bench to bedside." J Allergy Clin Immunol **118**(3): 582-586.
- Brancaccio, M., M. D. Edwards, et al. (2019). "Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals." Science **363**(6423): 187-192.
- Bronte, V. and M. J. Pittet (2013). "The spleen in local and systemic regulation of immunity." Immunity **39**(5): 806-818.
- Brown, S. A., G. Zumbrunn, et al. (2002). "Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks." Curr Biol **12**(18): 1574-1583.
- Bryant, P. A., J. Trinder, et al. (2004). "Sick and tired: Does sleep have a vital role in the immune system?" Nat Rev Immunol **4**(6): 457-467.
- Buenafe, A. C. (2012). "Diurnal rhythms are altered in a mouse model of multiple sclerosis." J Neuroimmunol **243**(1-2): 12-17.
- Buijs, R. M., S. J. Chun, et al. (2001). "Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake." J Comp Neurol **431**(4): 405-423.

- Buijs, R. M., J. Wortel, et al. (1999). "Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway." Eur J Neurosci **11**(5): 1535-1544.
- Cailotto, C., J. Lei, et al. (2009). "Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver." PLoS One **4**(5): e5650.
- Cain, D. W., E. G. O'Koren, et al. (2013). "Identification of a tissue-specific, C/EBPbeta-dependent pathway of differentiation for murine peritoneal macrophages." J Immunol **191**(9): 4665-4675.
- Camara, M. L., F. Corrigan, et al. (2015). "Tumor necrosis factor alpha and its receptors in behaviour and neurobiology of adult mice, in the absence of an immune challenge." Behav Brain Res **290**: 51-60.
- Cambras, T., L. Castejon, et al. (2012). "Social interaction with a rhythmic rat enhances the circadian pattern of the motor activity and temperature of LL-induced arrhythmic rats." Physiol Behav **105**(3): 835-840.
- Cardone, L., J. Hirayama, et al. (2005). "Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1." Science **309**(5739): 1390-1394.
- Carlson, D. E. and W. C. Chiu (2008). "The absence of circadian cues during recovery from sepsis modifies pituitary-adrenocortical function and impairs survival." Shock **29**(1): 127-132.
- Caroff, M., D. Karibian, et al. (2002). "Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides." Microbes Infect **4**(9): 915-926.
- Carrillo-Vico, A., J. M. Guerrero, et al. (2005). "A review of the multiple actions of melatonin on the immune system." Endocrine **27**(2): 189-200.
- Carswell, E. A., L. J. Old, et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-3670.
- Casey, L. C. (2000). "Immunologic response to infection and its role in septic shock." Crit Care Clin **16**(2): 193-213.
- Casiraghi, L. P., A. Alzamendi, et al. (2016). "Effects of chronic forced circadian desynchronization on body weight and metabolism in male mice." Physiol Rep **4**(8).
- Casiraghi, L. P., G. A. Oda, et al. (2012). "Forced desynchronization of activity rhythms in a model of chronic jet lag in mice." J Biol Rhythms **27**(1): 59-69.
- Cassado Ados, A., M. R. D'Imperio Lima, et al. (2015). "Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function." Front Immunol **6**: 225.
- Castanon-Cervantes, O., M. Wu, et al. (2010). "Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption." J Immunol **185**(10): 5796-5805.
- Cavadini, G., S. Petrzilka, et al. (2007). "TNF-alpha suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(31): 12843-12848.
- Cearley, C., L. Churchill, et al. (2003). "Time of day differences in IL1beta and TNFalpha mRNA levels in specific regions of the rat brain." Neurosci Lett **352**(1): 61-63.
- Cerra, F. B. (1985). "The systemic septic response: multiple systems organ failure." Crit Care Clin **1**(3): 591-607.
- Cinel, I. and S. M. Opal (2009). "Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer." Crit Care Med **37**(1): 291-304.



- Clark, D. P. Q., V. M. Perreau, et al. (2019). "Inflammation in Traumatic Brain Injury: Roles for Toxic A1 Astrocytes and Microglial-Astrocytic Crosstalk." Neurochem Res.
- Cohen, J., J. L. Vincent, et al. (2015). "Sepsis: a roadmap for future research." Lancet Infect Dis **15**(5): 581-614.
- Cordoba-Moreno, M. O., M. F. Toderó, et al. (2018). "Consequences of the Lack of IL-10 in Different Endotoxin Effects and its Relationship with Glucocorticoids." Shock.
- Cray, C., J. Zaias, et al. (2009). "Acute phase response in animals: a review." Comp Med **59**(6): 517-526.
- Cronin, L., D. J. Cook, et al. (1995). "Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature." Crit Care Med **23**(8): 1430-1439.
- Csoka, B., Z. H. Nemeth, et al. (2009). "CB2 cannabinoid receptors contribute to bacterial invasion and mortality in polymicrobial sepsis." PLoS One **4**(7): e6409.
- Cutolo, M., R. H. Straub, et al. (2008). "Circadian rhythms of nocturnal hormones in rheumatoid arthritis: translation from bench to bedside." Ann Rheum Dis **67**(7): 905-908.
- Czeisler, C. A., R. E. Kronauer, et al. (1989). "Bright light induction of strong (type 0) resetting of the human circadian pacemaker." Science **244**(4910): 1328-1333.
- Chai, O. H., E. H. Han, et al. (2011). "Mast cells play a key role in Th2 cytokine-dependent asthma model through production of adhesion molecules by liberation of TNF- $\alpha$ ." Exp Mol Med **43**(1): 35-43.
- Chen, P., M. Stanojic, et al. (2014). "Differences between murine and human sepsis." Surg Clin North Am **94**(6): 1135-1149.
- Chen, S. D., Z. H. Wen, et al. (2008). "Acute effect of methylprednisolone on the brain in a rat model of allergic asthma." Neurosci Lett **440**(2): 87-91.
- Cheng, Y., T. N. Marion, et al. (2018). "Park 7: A Novel Therapeutic Target for Macrophages in Sepsis-Induced Immunosuppression." Front Immunol **9**: 2632.
- Chuaiphichai, S., A. Starr, et al. (2016). "Endothelial cell tetrahydrobiopterin deficiency attenuates LPS-induced vascular dysfunction and hypotension." Vascul Pharmacol **77**: 69-79.
- Chun, L. E., E. R. Woodruff, et al. (2015). "Variations in Phase and Amplitude of Rhythmic Clock Gene Expression across Prefrontal Cortex, Hippocampus, Amygdala, and Hypothalamic Paraventricular and Suprachiasmatic Nuclei of Male and Female Rats." J Biol Rhythms **30**(5): 417-436.
- Dahdah, A., G. Gautier, et al. (2014). "Mast cells aggravate sepsis by inhibiting peritoneal macrophage phagocytosis." J Clin Invest **124**(10): 4577-4589.
- Damiola, F., N. Le Minh, et al. (2000). "Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus." Genes Dev **14**(23): 2950-2961.
- Danielski, L. G., A. D. Giustina, et al. (2018). "Brain Barrier Breakdown as a Cause and Consequence of Neuroinflammation in Sepsis." Mol Neurobiol **55**(2): 1045-1053.
- Dantzer, R. (2009). "Cytokine, sickness behavior, and depression." Immunol Allergy Clin North Am **29**(2): 247-264.

- Davies, L. C., M. Rosas, et al. (2011). "A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation." Eur J Immunol **41**(8): 2155-2164.
- Deane, R., B. LaRue, et al. (2009). "Endothelial protein C receptor-assisted transport of activated protein C across the mouse blood-brain barrier." J Cereb Blood Flow Metab **29**(1): 25-33.
- DeCoursey, P. J., J. R. Krulas, et al. (1997). "Circadian performance of suprachiasmatic nuclei (SCN)-lesioned antelope ground squirrels in a desert enclosure." Physiol Behav **62**(5): 1099-1108.
- Dejager, L., I. Pinheiro, et al. (2010). "Increased glucocorticoid receptor expression and activity mediate the LPS resistance of SPRET/EI mice." J Biol Chem **285**(40): 31073-31086.
- Del Rey, A., A. Randolph, et al. (2000). "Not all peripheral immune stimuli that activate the HPA axis induce proinflammatory cytokine gene expression in the hypothalamus." Ann N Y Acad Sci **917**: 169-174.
- Dendoncker, K. and C. Libert (2017). "Glucocorticoid resistance as a major drive in sepsis pathology." Cytokine Growth Factor Rev **35**: 85-96.
- Deshmane, S. L., S. Kremlev, et al. (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." J Interferon Cytokine Res **29**(6): 313-326.
- Dibner, C., U. Schibler, et al. (2010). "The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks." Annu Rev Physiol **72**: 517-549.
- Dimitrov, S., C. Benedict, et al. (2009). "Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets." Blood **113**(21): 5134-5143.
- Doherty, T. A., P. Soroosh, et al. (2011). "The tumor necrosis factor family member LIGHT is a target for asthmatic airway remodeling." Nat Med **17**(5): 596-603.
- Drexhage, R. C., K. Weigelt, et al. (2011). "Immune and neuroimmune alterations in mood disorders and schizophrenia." Int Rev Neurobiol **101**: 169-201.
- Duhart, J. M., L. Brocardo, et al. (2016). "CCL2 mediates the circadian response to low dose endotoxin." Neuropharmacology **108**: 373-381.
- Duhart, J. M., M. J. Leone, et al. (2013). "Suprachiasmatic astrocytes modulate the circadian clock in response to TNF-alpha." J Immunol **191**(9): 4656-4664.
- Dunkelberger, J. R. and W. C. Song (2010). "Complement and its role in innate and adaptive immune responses." Cell Res **20**(1): 34-50.
- Dunlap J.C., L. J. J. D. C. P. J. (2003). Chronobiology: Biological Timekeeping. Sunderland, MA, Sinauer Associates Publishers.
- Dunlap, J. C. (1999). "Molecular bases for circadian clocks." Cell **96**(2): 271-290.
- Dwivedy, A. and P. Aich (2011). "Importance of innate mucosal immunity and the promises it holds." Int J Gen Med **4**: 299-311.
- Edmonds, S. C. (1977). "Food and light as entrainers of circadian running activity in the rat." Physiol Behav **18**(5): 915-919.
- Ehlers, A., W. Xie, et al. (2018). "BMAL1 links the circadian clock to viral airway pathology and asthma phenotypes." Mucosal Immunol **11**(1): 97-111.
- Eide, E. J., H. Kang, et al. (2005). "Casein kinase I in the mammalian circadian clock." Methods Enzymol **393**: 408-418.
- Eide, E. J., E. L. Vielhaber, et al. (2002). "The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon." J Biol Chem **277**(19): 17248-17254.

- Elias, J. (2004). "The relationship between asthma and COPD. Lessons from transgenic mice." Chest **126**(2 Suppl): 111S-116S; discussion 159S-161S.
- Fainboim, L. G., J. (2011). Introducción a la Inmunología Humana. Buenos Aires, Argentina, Editorial Médica Panamericana.
- Fei, G. H., R. Y. Liu, et al. (2004). "Alterations in circadian rhythms of melatonin and cortisol in patients with bronchial asthma." Acta Pharmacol Sin **25**(5): 651-656.
- Filipski, E., P. Subramanian, et al. (2009). "Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice." Mutat Res **680**(1-2): 95-105.
- Fink, T., M. Glas, et al. (2014). "Melatonin receptors mediate improvements of survival in a model of polymicrobial sepsis." Crit Care Med **42**(1): e22-31.
- Fisher, C. J., Jr., S. M. Opal, et al. (1993). "Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group." Crit Care Med **21**(3): 318-327.
- Fleshner, M., L. E. Goehler, et al. (1998). "Thermogenic and corticosterone responses to intravenous cytokines (IL-1beta and TNF-alpha) are attenuated by subdiaphragmatic vagotomy." J Neuroimmunol **86**(2): 134-141.
- Floyd, R. A. and J. M. Krueger (1997). "Diurnal variation of TNF alpha in the rat brain." Neuroreport **8**(4): 915-918.
- Fonken, L. K., T. G. Aubrecht, et al. (2013). "Dim light at night disrupts molecular circadian rhythms and increases body weight." J Biol Rhythms **28**(4): 262-271.
- Fonken, L. K., M. G. Frank, et al. (2015). "Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock." Brain Behav Immun **45**: 171-179.
- Fonseca, M. T., A. C. Rodrigues, et al. (2016). "Spontaneous hypothermia in human sepsis is a transient, self-limiting, and nonterminal response." J Appl Physiol (1985) **120**(12): 1394-1401.
- Forrester, J. V., P. G. McMenamin, et al. (2018). "CNS infection and immune privilege." Nat Rev Neurosci **19**(11): 655-671.
- Fortier, E. E., J. Rooney, et al. (2011). "Circadian variation of the response of T cells to antigen." J Immunol **187**(12): 6291-6300.
- Frey, D. J., M. Fleshner, et al. (2007). "The effects of 40 hours of total sleep deprivation on inflammatory markers in healthy young adults." Brain Behav Immun **21**(8): 1050-1057.
- Funk, D. J., J. E. Parrillo, et al. (2009). "Sepsis and septic shock: a history." Crit Care Clin **25**(1): 83-101, viii.
- Galley, H. F. (2011). "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis." Br J Anaesth **107**(1): 57-64.
- Garami, A., A. A. Steiner, et al. (2018). "Fever and hypothermia in systemic inflammation." Handb Clin Neurol **157**: 565-597.
- Gasteiger, G., A. D'Oswaldo, et al. (2017). "Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players." J Innate Immun **9**(2): 111-125.
- Gatti, S. and T. Bartfai (1993). "Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6." Brain Res **624**(1-2): 291-294.
- Ghosn, E. E., A. A. Cassado, et al. (2010). "Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(6): 2568-2573.

- Gilibert, S., L. Galle-Treger, et al. (2014). "Adrenocortical scavenger receptor class B type I deficiency exacerbates endotoxic shock and precipitates sepsis-induced mortality in mice." J Immunol **193**(2): 817-826.
- Gogos, C. A., E. Drosou, et al. (2000). "Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options." J Infect Dis **181**(1): 176-180.
- Goldenberg, N. M., B. E. Steinberg, et al. (2011). "Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis." Sci Transl Med **3**(88): 88ps25.
- Golombek, D. A. (2007). Cronobiología humana. Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad. Quilmes, Buenos Aires, Argentina, Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes.
- Golombek, D. A., L. P. Casiraghi, et al. (2013). "The times they're a-changing: effects of circadian desynchronization on physiology and disease." J Physiol Paris **107**(4): 310-322.
- Golombek, D. A., G. A. Ferreyra, et al. (2003). "From light to genes: moving the hands of the circadian clock." Front Biosci **8**: s285-293.
- Golombek, D. A. and R. E. Rosenstein (2010). "Physiology of circadian entrainment." Physiol Rev **90**(3): 1063-1102.
- Granger, J. I., P. L. Ratti, et al. (2013). "Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain." Psychoneuroendocrinology **38**(7): 1047-1057.
- Green, D. R. (2000). "Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors." Cell **102**(1): 1-4.
- Grell, M. (1995). "Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF." J Inflamm **47**(1-2): 8-17.
- Gruys, E., M. J. Toussaint, et al. (2005). "Acute phase reaction and acute phase proteins." J Zhejiang Univ Sci B **6**(11): 1045-1056.
- Guerrero-Vargas, N. N., R. Salgado-Delgado, et al. (2014). "Reciprocal interaction between the suprachiasmatic nucleus and the immune system tunes down the inflammatory response to lipopolysaccharide." J Neuroimmunol **273**(1-2): 22-30.
- Guo, Z., S. Wang, et al. (2009). "Soluble TNFR II/IgG1 Fc fusion protein treatment in the LPS-mediated septic shock of rats." Biomed Pharmacother **63**(7): 537-542.
- Guzman-Ruiz, M. A., A. Ramirez-Corona, et al. (2015). "Role of the Suprachiasmatic and Arcuate Nuclei in Diurnal Temperature Regulation in the Rat." J Neurosci **35**(46): 15419-15429.
- Halberg, F., E. A. Johnson, et al. (1960). "Susceptibility rhythm to E. coli endotoxin and bioassay." Proc Soc Exp Biol Med **103**: 142-144.
- Hale, K. K., C. G. Smith, et al. (1995). "Multifunctional regulation of the biological effects of TNF-alpha by the soluble type I and type II TNF receptors." Cytokine **7**(1): 26-38.
- Hamelmann, E. and E. W. Gelfand (2001). "IL-5-induced airway eosinophilia--the key to asthma?" Immunol Rev **179**: 182-191.
- Hansen, M. K., K. T. Nguyen, et al. (2000). "Effects of vagotomy on lipopolysaccharide-induced brain interleukin-1beta protein in rats." Auton Neurosci **85**(1-3): 119-126.
- Harada, Y., H. Edamatsu, et al. (2011). "PLCepsilon cooperates with the NF-kappaB pathway to augment TNFalpha-stimulated CCL2/MCP1

- expression in human keratinocyte." Biochem Biophys Res Commun **414**(1): 106-111.
- Hare, A. S., G. Clarke, et al. (1995). "Bacterial lipopolysaccharide-induced changes in FOS protein expression in the rat brain: correlation with thermoregulatory changes and plasma corticosterone." J Neuroendocrinol **7**(10): 791-799.
- Hashiramoto, A., T. Yamane, et al. (2010). "Mammalian clock gene Cryptochrome regulates arthritis via proinflammatory cytokine TNF-alpha." J Immunol **184**(3): 1560-1565.
- Hastings, M. H., G. E. Duffield, et al. (1997). "Non-photoc signalling in the suprachiasmatic nucleus." Biol Cell **89**(8): 495-503.
- Hastings, M. H. and E. D. Herzog (2004). "Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei." J Biol Rhythms **19**(5): 400-413.
- Haus, E. and M. H. Smolensky (1999). "Biologic rhythms in the immune system." Chronobiol Int **16**(5): 581-622.
- Hawari, F. I., F. N. Rouhani, et al. (2004). "Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: a mechanism for generation of soluble cytokine receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1297-1302.
- Hawkins, B. T. and T. P. Davis (2005). "The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease." Pharmacol Rev **57**(2): 173-185.
- Hayashi, M., S. Shimba, et al. (2007). "Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages." Biol Pharm Bull **30**(4): 621-626.
- Hehlgans, T. and K. Pfeffer (2005). "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games." Immunology **115**(1): 1-20.
- Herman, J. P. and J. G. Tasker (2016). "Paraventricular Hypothalamic Mechanisms of Chronic Stress Adaptation." Front Endocrinol (Lausanne) **7**: 137.
- Hermes, M. L., E. M. Coderre, et al. (1996). "GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from suprachiasmatic nucleus to hypothalamic paraventricular nucleus in rat." J Physiol **496 ( Pt 3)**: 749-757.
- Herrero, L., L. Valcarcel, et al. (2015). "Altered circadian rhythm and metabolic gene profile in rats subjected to advanced light phase shifts." PLoS One **10**(4): e0122570.
- Hight, K., H. Hallett, et al. (2010). "Time of day differences in the number of cytokine-, neurotrophin- and NeuN-immunoreactive cells in the rat somatosensory or visual cortex." Brain Res **1337**: 32-40.
- Ho, A. W., C. K. Wong, et al. (2008). "Tumor necrosis factor-alpha up-regulates the expression of CCL2 and adhesion molecules of human proximal tubular epithelial cells through MAPK signaling pathways." Immunobiology **213**(7): 533-544.
- Hofer, S., C. Bopp, et al. (2008). "Injury of the blood brain barrier and up-regulation of icam-1 in polymicrobial sepsis." J Surg Res **146**(2): 276-281.
- Holgate, S. T., J. R. Wilson, et al. (1992). "New insights into airway inflammation by endobronchial biopsy." Am Rev Respir Dis **145**(2 Pt 2): S2-6.
- Honma, K. I. and T. Hiroshige (1978). "Internal synchronization among several circadian rhythms in rats under constant light." Am J Physiol **235**(5): R243-249.

- Hosoi, T., Y. Okuma, et al. (2005). "Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation: possible role of nodose ganglion." Auton Neurosci **120**(1-2): 104-107.
- Hotchkiss, R. S. and I. E. Karl (2003). "The pathophysiology and treatment of sepsis." N Engl J Med **348**(2): 138-150.
- Hotchkiss, R. S., A. Strasser, et al. (2009). "Cell death." N Engl J Med **361**(16): 1570-1583.
- Hower, I. M., S. A. Harper, et al. (2018). "Circadian Rhythms, Exercise, and Cardiovascular Health." J Circadian Rhythms **16**: 7.
- Hrushesky, W. J., T. Langevin, et al. (1994). "Circadian dynamics of tumor necrosis factor alpha (cachectin) lethality." J Exp Med **180**(3): 1059-1065.
- Hueston, C. M. and T. Deak (2014). "The inflamed axis: the interaction between stress, hormones, and the expression of inflammatory-related genes within key structures comprising the hypothalamic-pituitary-adrenal axis." Physiol Behav **124**: 77-91.
- Huston, J. M., M. Ochani, et al. (2006). "Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis." J Exp Med **203**(7): 1623-1628.
- Hutchison, S., B. S. Choo-Kang, et al. (2008). "Tumour necrosis factor-alpha blockade suppresses murine allergic airways inflammation." Clin Exp Immunol **151**(1): 114-122.
- Ip, W. K. E., N. Hoshi, et al. (2017). "Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages." Science **356**(6337): 513-519.
- Irwin, M. (2002). "Effects of sleep and sleep loss on immunity and cytokines." Brain Behav Immun **16**(5): 503-512.
- Iwamoto, A., M. Kawai, et al. (2014). "Effects of chronic jet lag on the central and peripheral circadian clocks in CBA/N mice." Chronobiol Int **31**(2): 189-198.
- Jack, R. S., X. Fan, et al. (1997). "Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection." Nature **389**(6652): 742-745.
- Jarjour, N. N. (1999). "Circadian variation in allergen and nonspecific bronchial responsiveness in asthma." Chronobiol Int **16**(5): 631-639.
- Jevtic, S., A. S. Sengar, et al. (2017). "The role of the immune system in Alzheimer disease: Etiology and treatment." Ageing Res Rev **40**: 84-94.
- Jiang, Y., J. D. Woronicz, et al. (1999). "Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains." Science **283**(5401): 543-546.
- Johnson, R. H., D. T. Kho, et al. (2018). "The functional and inflammatory response of brain endothelial cells to Toll-Like Receptor agonists." Sci Rep **8**(1): 10102.
- Johnston, J. G. and D. M. Pollock (2018). "Circadian regulation of renal function." Free Radic Biol Med **119**: 93-107.
- Kakizaki, Y., H. Watanobe, et al. (1999). "Temporal profiles of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in the plasma and hypothalamic paraventricular nucleus after intravenous or intraperitoneal administration of lipopolysaccharide in the rat: estimation by push-pull perfusion." Endocr J **46**(4): 487-496.
- Kalsbeek, A., I. F. Palm, et al. (2006). "SCN outputs and the hypothalamic balance of life." J Biol Rhythms **21**(6): 458-469.

- Karatsoreos, I. N., L. Yan, et al. (2004). "Phenotype matters: identification of light-responsive cells in the mouse suprachiasmatic nucleus." J Neurosci **24**(1): 68-75.
- Karlsson, B., A. Knutsson, et al. (2001). "Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people." Occup Environ Med **58**(11): 747-752.
- Karlsson, B. H., A. K. Knutsson, et al. (2003). "Metabolic disturbances in male workers with rotating three-shift work. Results of the WOLF study." Int Arch Occup Environ Health **76**(6): 424-430.
- Kasahara, E. and M. Inoue (2015). "Cross-talk between HPA-axis-increased glucocorticoids and mitochondrial stress determines immune responses and clinical manifestations of patients with sepsis." Redox Rep **20**(1): 1-10.
- Kaur, J., P. Singhi, et al. (2016). "Neurodevelopmental and Behavioral Outcomes in Children With Sepsis-Associated Encephalopathy Admitted to Pediatric Intensive Care Unit: A Prospective Case Control Study." J Child Neurol **31**(6): 683-690.
- Keller, M., J. Mazuch, et al. (2009). "A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(50): 21407-21412.
- Kelly, E. A., J. J. Houtman, et al. (2004). "Inflammatory changes associated with circadian variation in pulmonary function in subjects with mild asthma." Clin Exp Allergy **34**(2): 227-233.
- Khassawneh, B., S. C. Tsai, et al. (2019). "Polysomnographic characteristics of adolescents with asthma and low risk for sleep-disordered breathing." Sleep Breath.
- Kim, M. S., K. A. Cho, et al. (2013). "Effects of interleukin-9 blockade on chronic airway inflammation in murine asthma models." Allergy Asthma Immunol Res **5**(4): 197-206.
- Kim, Y. S., H. M. Ko, et al. (2007). "Mast cells play a key role in the development of late airway hyperresponsiveness through TNF-alpha in a murine model of asthma." Eur J Immunol **37**(4): 1107-1115.
- Kleber, A., S. Altmeyer, et al. (2014). "Impact of melatonin receptor deletion on intracellular signaling in spleen cells of mice after polymicrobial sepsis." Inflamm Res **63**(12): 1023-1033.
- Klir, J. J., J. L. McClellan, et al. (1995). "Systemic but not central administration of tumor necrosis factor-alpha attenuates LPS-induced fever in rats." Am J Physiol **268**(2 Pt 2): R480-486.
- Kluger, M. J. (1991). "Fever: role of pyrogens and cryogens." Physiol Rev **71**(1): 93-127.
- Ko, C. H. and J. S. Takahashi (2006). "Molecular components of the mammalian circadian clock." Hum Mol Genet **15 Spec No 2**: R271-277.
- Kollias, G., E. Douni, et al. (1999). "The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease." Ann Rheum Dis **58 Suppl 1**: I32-39.
- Kornhauser, J. M., K. E. Mayo, et al. (1996). "Light, immediate-early genes, and circadian rhythms." Behav Genet **26**(3): 221-240.

- Kothari, L. S., P. N. Shah, et al. (1982). "Effect of continuous light on the incidence of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene induced mammary tumors in female Holtzman rats." Cancer Lett **16**(3): 313-317.
- Kouri, V. P., J. Olkkonen, et al. (2013). "Circadian timekeeping is disturbed in rheumatoid arthritis at molecular level." PLoS One **8**(1): e54049.
- Kraft, M., R. Djukanovic, et al. (1996). "Alveolar tissue inflammation in asthma." Am J Respir Crit Care Med **154**(5): 1505-1510.
- Krausgruber, T., K. Blazek, et al. (2011). "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses." Nat Immunol **12**(3): 231-238.
- Kriegsfeld, L. J., R. K. Leak, et al. (2004). "Organization of suprachiasmatic nucleus projections in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*): an anterograde and retrograde analysis." J Comp Neurol **468**(3): 361-379.
- Kroon, J., S. Tol, et al. (2013). "The small GTPase RhoB regulates TNFalpha signaling in endothelial cells." PLoS One **8**(9): e75031.
- Krueger, J. M. (2008). "The role of cytokines in sleep regulation." Curr Pharm Des **14**(32): 3408-3416.
- Kubes, P. (2016). "The versatile platelet contributes to inflammation, infection, hemostasis, coagulation and cancer." Semin Immunol **28**(6): 535.
- Kwak, Y., G. B. Lundkvist, et al. (2008). "Interferon-gamma alters electrical activity and clock gene expression in suprachiasmatic nucleus neurons." J Biol Rhythms **23**(2): 150-159.
- Kwon, Y. S., G. Y. Suh, et al. (2007). "Basal serum cortisol levels are not predictive of response to corticotropin but have prognostic significance in patients with septic shock." J Korean Med Sci **22**(3): 470-475.
- Laflamme, N. and S. Rivest (2001). "Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components." FASEB J **15**(1): 155-163.
- Lahti, T. A., S. Leppamaki, et al. (2006). "Transition to daylight saving time reduces sleep duration plus sleep efficiency of the deprived sleep." Neurosci Lett **406**(3): 174-177.
- Laitinen, L. A., A. Laitinen, et al. (1993). "Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma." Am Rev Respir Dis **147**(3): 697-704.
- Lamping, N., R. Dettmer, et al. (1998). "LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria." J Clin Invest **101**(10): 2065-2071.
- Lampron, A., A. Elali, et al. (2013). "Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and its environment." Neuron **78**(2): 214-232.
- Lange, T., S. Dimitrov, et al. (2010). "Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system." Ann N Y Acad Sci **1193**: 48-59.
- Laye, S., P. Parnet, et al. (1994). "Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice." Brain Res Mol Brain Res **27**(1): 157-162.
- Lee, J. J., M. P. McGarry, et al. (1997). "Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma." J Exp Med **185**(12): 2143-2156.
- Lee, Y. G., J. J. Jeong, et al. (2015). "Recruited alveolar macrophages, in response to airway epithelial-derived monocyte chemoattractant protein



- 1/CCl<sub>2</sub>, regulate airway inflammation and remodeling in allergic asthma." Am J Respir Cell Mol Biol **52**(6): 772-784.
- Leendertse, M., R. J. Willems, et al. (2009). "Peritoneal macrophages are important for the early containment of *Enterococcus faecium* peritonitis in mice." Innate Immun **15**(1): 3-12.
- Lehman, M. N., R. Silver, et al. (1987). "Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain." J Neurosci **7**(6): 1626-1638.
- Lemmer, B. and H. Oster (2018). "The Role of Circadian Rhythms in the Hypertension of Diabetes Mellitus and the Metabolic Syndrome." Curr Hypertens Rep **20**(5): 43.
- Leon, L. R., A. A. White, et al. (1998). "Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice." Am J Physiol **275**(1 Pt 2): R269-277.
- Leone, M. J., L. Marpegan, et al. (2006). "Suprachiasmatic astrocytes as an interface for immune-circadian signalling." J Neurosci Res **84**(7): 1521-1527.
- Leone, M. J., L. Marpegan, et al. (2012). "Role of proinflammatory cytokines on lipopolysaccharide-induced phase shifts in locomotor activity circadian rhythm." Chronobiol Int **29**(6): 715-723.
- Levi, M., M. Schultz, et al. (2010). "Disseminated intravascular coagulation in infectious disease." Semin Thromb Hemost **36**(4): 367-377.
- Levine, J. D., P. Funes, et al. (2002). "Signal analysis of behavioral and molecular cycles." BMC Neurosci **3**: 1.
- Li, P., Q. L. Liang, et al. (2014). "Protective effects of the active fraction from the tuber of *Scirpus yagara* in mouse endotoxin shock model." J Ethnopharmacol **158 Pt A**: 331-337.
- Liao, Y. R. and J. Y. Lin (2015). "Quercetin intraperitoneal administration ameliorates lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in mice." Life Sci **137**: 89-97.
- Licinio, J. and M. L. Wong (1997). "Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system." J Clin Invest **100**(12): 2941-2947.
- Lightman, S. L. and B. L. Conway-Campbell (2010). "The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration." Nat Rev Neurosci **11**(10): 710-718.
- Liu, E., K. Lewis, et al. (2012). "Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and *Escherichia coli*-induced systemic inflammation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **302**(12): R1372-1383.
- Liu, G., X. P. Xia, et al. (2006). "The macrophage heterogeneity: difference between mouse peritoneal exudate and splenic F4/80+ macrophages." J Cell Physiol **209**(2): 341-352.
- Liu, J., G. Malkani, et al. (2006). "The circadian clock *Period 2* gene regulates gamma interferon production of NK cells in host response to lipopolysaccharide-induced endotoxic shock." Infect Immun **74**(8): 4750-4756.
- Liu, W. Y., Z. B. Wang, et al. (2015). "Increasing the Permeability of the Blood-brain Barrier in Three Different Models in vivo." CNS Neurosci Ther **21**(7): 568-574.

- Logan, R. W., A. Arjona, et al. (2011). "Role of sympathetic nervous system in the entrainment of circadian natural-killer cell function." Brain Behav Immun **25**(1): 101-109.
- Long, N. C., A. Morimoto, et al. (1992). "Systemic injection of TNF-alpha attenuates fever due to IL-1 beta and LPS in rats." Am J Physiol **263**(5 Pt 2): R987-991.
- Lorente, L., M. M. Martin, et al. (2015). "Serum melatonin levels are associated with mortality in severe septic patients." J Crit Care **30**(4): 860 e861-866.
- Lowrey, P. L., K. Shimomura, et al. (2000). "Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau." Science **288**(5465): 483-492.
- Lowrey, P. L. and J. S. Takahashi (2004). "Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization." Annu Rev Genomics Hum Genet **5**: 407-441.
- Lu, J., Y. H. Zhang, et al. (2001). "Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation." J Neurosci **21**(13): 4864-4874.
- Luan, Y. Y., Y. M. Yao, et al. (2015). "Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis." J Interferon Cytokine Res **35**(1): 17-22.
- Luheshi, G. N., A. Stefferl, et al. (1997). "Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral and brain IL-1 and TNF-alpha in the rat." Am J Physiol **272**(3 Pt 2): R862-868.
- Lundkvist, G. B., B. Robertson, et al. (1998). "Expression of an oscillating interferon-gamma receptor in the suprachiasmatic nuclei." Neuroreport **9**(6): 1059-1063.
- Luo, F., X. Liu, et al. (2004). "Melatonin promoted chemotaxins expression in lung epithelial cell stimulated with TNF-alpha." Respir Res **5**: 20.
- Lv, S., M. Han, et al. (2014). "Anti-TNF-alpha therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis." Int J Clin Pract **68**(4): 520-528.
- Lloyd, C. M. (2007). "Building better mouse models of asthma." Curr Allergy Asthma Rep **7**(3): 231-236.
- Mackic, J. B., J. Bading, et al. (2002). "Circulating amyloid-beta peptide crosses the blood-brain barrier in aged monkeys and contributes to Alzheimer's disease lesions." Vascul Pharmacol **38**(6): 303-313.
- Madrid, J. A. R. d. L., M.A. (2006). Cronobiología Básica y Clínica. Madrid, España, Editeca Red.
- Magrini, A., A. Pietroiusti, et al. (2006). "Shift work and autoimmune thyroid disorders." Int J Immunopathol Pharmacol **19**(4 Suppl): 31-36.
- Malaviya, R., J. D. Laskin, et al. (2017). "Anti-TNFalpha therapy in inflammatory lung diseases." Pharmacol Ther **180**: 90-98.
- Mallard, C. (2012). "Innate immune regulation by toll-like receptors in the brain." ISRN Neurol **2012**: 701950.
- Marchant, A., J. Deviere, et al. (1994). "Interleukin-10 production during septicaemia." Lancet **343**(8899): 707-708.
- Marie, C., C. Pitton, et al. (1996). "Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGFbeta) of interleukin-8 production by LPS- and/ or TNFalpha-activated human polymorphonuclear cells." Mediators Inflamm **5**(5): 334-340.
- Marpegan, L., T. A. Bekinschtein, et al. (2005). "Circadian responses to endotoxin treatment in mice." J Neuroimmunol **160**(1-2): 102-109.

- Marpegan, L., T. A. Bekinschtein, et al. (2004). "Participation of transcription factors from the Rel/NF-kappa B family in the circadian system in hamsters." Neurosci Lett **358**(1): 9-12.
- Marpegan, L., M. J. Leone, et al. (2009). "Diurnal variation in endotoxin-induced mortality in mice: correlation with proinflammatory factors." Chronobiol Int **26**(7): 1430-1442.
- Martino, T. A. and M. E. Young (2015). "Influence of the cardiomyocyte circadian clock on cardiac physiology and pathophysiology." J Biol Rhythms **30**(3): 183-205.
- Martins, E., Jr., A. P. Ligeiro de Oliveira, et al. (2001). "Melatonin modulates allergic lung inflammation." J Pineal Res **31**(4): 363-369.
- Mateju, K., Z. Bendova, et al. (2009). "Development of the light sensitivity of the clock genes Period1 and Period2, and immediate-early gene c-fos within the rat suprachiasmatic nucleus." Eur J Neurosci **29**(3): 490-501.
- Matera, M. G., L. Calzetta, et al. (2010). "TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water." Pulm Pharmacol Ther **23**(2): 121-128.
- McCusker, R. H. and K. W. Kelley (2013). "Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior." J Exp Biol **216**(Pt 1): 84-98.
- Meltzer, L. J. and C. E. Pugliese (2017). "Sleep in young children with asthma and their parents." J Child Health Care **21**(3): 301-311.
- Meneses, G., G. Cardenas, et al. (2019). "Sepsis: developing new alternatives to reduce neuroinflammation and attenuate brain injury." Ann N Y Acad Sci **1437**(1): 43-56.
- Mihaylova, S., H. Schweighofer, et al. (2014). "Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation in endotoxemic rats on blood and spleen lymphocyte subsets." Inflamm Res **63**(8): 683-690.
- Mina, F., C. M. Comim, et al. (2014). "Il1-beta involvement in cognitive impairment after sepsis." Mol Neurobiol **49**(2): 1069-1076.
- Minors, D. S., J. M. Waterhouse, et al. (1991). "A human phase-response curve to light." Neurosci Lett **133**(1): 36-40.
- Mishra, H. K., T. J. Johnson, et al. (2016). "Targeting ADAM17 in leukocytes increases neutrophil recruitment and reduces bacterial spread during polymicrobial sepsis." J Leukoc Biol **100**(5): 999-1004.
- Mohler, K. M., D. S. Torrance, et al. (1993). "Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists." J Immunol **151**(3): 1548-1561.
- Moore, R. Y. and V. B. Eichler (1972). "Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat." Brain Res **42**(1): 201-206.
- Moore, R. Y. and N. J. Lenn (1972). "A retinohypothalamic projection in the rat." J Comp Neurol **146**(1): 1-14.
- Moore, R. Y. and J. C. Speh (1993). "GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system." Neurosci Lett **150**(1): 112-116.
- Morrison, S. F. (2016). "Central control of body temperature." F1000Res **5**.
- Morrison, S. F. (2018). "Efferent neural pathways for the control of brown adipose tissue thermogenesis and shivering." Handb Clin Neurol **156**: 281-303.

- Murphy, K. W., C. (2017). Janeway's immunobiology Nueva York, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nat Rev Immunol **11**(11): 723-737.
- Nagoshi, E., C. Saini, et al. (2004). "Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells." Cell **119**(5): 693-705.
- Naidu, K. S., L. W. Morgan, et al. (2010). "Inflammation in the avian spleen: timing is everything." BMC Mol Biol **11**: 104.
- Najam, F. I., A. S. Giasuddin, et al. (2001). "Tumour necrosis factors in childhood asthma." Indian J Pediatr **68**(3): 217-222.
- Nakae, S., C. Lunderius, et al. (2007). "TNF can contribute to multiple features of ovalbumin-induced allergic inflammation of the airways in mice." J Allergy Clin Immunol **119**(3): 680-686.
- Narasimamurthy, R., M. Hatori, et al. (2012). "Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(31): 12662-12667.
- Nassenstein, C., G. Krasteva-Christ, et al. (2018). "New aspects of neuroinflammation and neuroimmune crosstalk in the airways." J Allergy Clin Immunol **142**(5): 1415-1422.
- Nautiyal, K. M., H. McKellar, et al. (2009). "Mast cells are necessary for the hypothermic response to LPS-induced sepsis." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **296**(3): R595-602.
- Nguyen, K. D., S. J. Fentress, et al. (2013). "Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes." Science **341**(6153): 1483-1488.
- Nochi, T. and H. Kiyono (2006). "Innate immunity in the mucosal immune system." Curr Pharm Des **12**(32): 4203-4213.
- Nygaard, M., G. B. Lundkvist, et al. (2009). "Rapid nitric oxide-dependent effects of tumor necrosis factor-alpha on suprachiasmatic nuclei neuronal activity." Neuroreport **20**(2): 213-217.
- O'Keefe, S. M., A. L. Beynon, et al. (2017). "NF-kappaB signalling is involved in immune-modulation, but not basal functioning, of the mouse suprachiasmatic circadian clock." Eur J Neurosci **45**(8): 1111-1123.
- Ogawa, Y., Y. Irukayama-Tomobe, et al. (2016). "Peripherally administered orexin improves survival of mice with endotoxin shock." Elife **5**.
- Oishi, K., S. Higo-Yamamoto, et al. (2015). "Disrupted light-dark cycle abolishes circadian expression of peripheral clock genes without inducing behavioral arrhythmicity in mice." Biochem Biophys Res Commun **458**(2): 256-261.
- Oishi, K., N. Ohkura, et al. (2007). "Food deprivation induces adipose plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression without accumulation of plasma PAI-1 in genetically obese and diabetic db/db mice." Thromb Haemost **98**(4): 864-870.
- Okabe, Y. and R. Medzhitov (2014). "Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages." Cell **157**(4): 832-844.
- Okada, K., M. Yano, et al. (2008). "Injection of LPS causes transient suppression of biological clock genes in rats." J Surg Res **145**(1): 5-12.
- Okamoto, K., T. Tamura, et al. (2016). "Sepsis and disseminated intravascular coagulation." J Intensive Care **4**: 23.

- Opal, S. M. (1999). "Tumor necrosis factor receptor expression on inflammatory cells in sepsis." Crit Care Med **27**(2): 240-241.
- Paladino, N., M. J. Leone, et al. (2010). "Paying the circadian toll: the circadian response to LPS injection is dependent on the Toll-like receptor 4." J Neuroimmunol **225**(1-2): 62-67.
- Paricahua, L. I., A. F. O. Goncalves, et al. (2017). "Sepsis Mortality in Critical Care and Prior Statin Therapy: A Retrospective Cohort Study in Central Argentina." J Clin Diagn Res **11**(6): OC17-OC21.
- Parker, G. A. and C. A. Picut (2005). "Liver immunobiology." Toxicol Pathol **33**(1): 52-62.
- Partch, C. L., C. B. Green, et al. (2014). "Molecular architecture of the mammalian circadian clock." Trends Cell Biol **24**(2): 90-99.
- Pavlov, V. A. and K. J. Tracey (2012). "The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism." Nat Rev Endocrinol **8**(12): 743-754.
- Pepe, C., S. Foley, et al. (2005). "Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma." J Allergy Clin Immunol **116**(3): 544-549.
- Persengiev, S. P. and M. R. Green (2003). "The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis." Apoptosis **8**(3): 225-228.
- Peter, R., L. Alfredsson, et al. (1999). "Does a stressful psychosocial work environment mediate the effects of shift work on cardiovascular risk factors?" Scand J Work Environ Health **25**(4): 376-381.
- Petrovsky, N. and L. C. Harrison (1997). "Diurnal rhythmicity of human cytokine production: a dynamic disequilibrium in T helper cell type 1/T helper cell type 2 balance?" J Immunol **158**(11): 5163-5168.
- Petrzilka, S., C. Taraborrelli, et al. (2009). "Clock gene modulation by TNF-alpha depends on calcium and p38 MAP kinase signaling." J Biol Rhythms **24**(4): 283-294.
- Pfeffer, K., T. Matsuyama, et al. (1993). "Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection." Cell **73**(3): 457-467.
- Phillips, D. J., M. I. Savenkova, et al. (2015). "Environmental disruption of the circadian clock leads to altered sleep and immune responses in mouse." Brain Behav Immun **47**: 14-23.
- Pinato, L., S. da Silveira Cruz-Machado, et al. (2015). "Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis." Brain Struct Funct **220**(2): 827-840.
- Pitossi, F., A. del Rey, et al. (1997). "Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice." J Neurosci Res **48**(4): 287-298.
- Pittendrigh, C. S. (1954). "On Temperature Independence in the Clock System Controlling Emergence Time in Drosophila." Proc Natl Acad Sci U S A **40**(10): 1018-1029.
- Pittendrigh, C. S. (1981). Circadian systems: Entrainment. Nueva York, Plenum.
- Plano, S. A., P. V. Agostino, et al. (2007). "Extracellular nitric oxide signaling in the hamster biological clock." FEBS Lett **581**(28): 5500-5504.
- Pollmacher, T., J. Mullington, et al. (1996). "Diurnal variations in the human host response to endotoxin." J Infect Dis **174**(5): 1040-1045.

- Poon, V. Y., S. Choi, et al. (2013). "Growth factors in synaptic function." Front Synaptic Neurosci **5**: 6.
- Rakos, G., Z. Kis, et al. (2007). "Evans Blue fluorescence permits the rapid visualization of non-intact cells in the perilesional rim of cold-injured rat brain." Acta Neurobiol Exp (Wars) **67**(2): 149-154.
- Ralph, M. R. and M. Menaker (1988). "A mutation of the circadian system in golden hamsters." Science **241**(4870): 1225-1227.
- Ramos-Benitez, M. J., C. Ruiz-Jimenez, et al. (2018). "Fh15 Blocks the Lipopolysaccharide-Induced Cytokine Storm While Modulating Peritoneal Macrophage Migration and CD38 Expression within Spleen Macrophages in a Mouse Model of Septic Shock." mSphere **3**(6).
- Ransohoff, R. M. and M. A. Brown (2012). "Innate immunity in the central nervous system." J Clin Invest **122**(4): 1164-1171.
- Ransohoff, R. M. and B. Engelhardt (2012). "The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system." Nat Rev Immunol **12**(9): 623-635.
- Reddy, A. B., M. D. Field, et al. (2002). "Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag." J Neurosci **22**(17): 7326-7330.
- Refinetti, R. and M. Menaker (1992). "The circadian rhythm of body temperature." Physiol Behav **51**(3): 613-637.
- Remick, D. G. and H. Xia (2006). "Hypothermia and sepsis." Front Biosci **11**: 1006-1013.
- Roberts, T. K., E. A. Eugenin, et al. (2012). "CCL2 disrupts the adherens junction: implications for neuroinflammation." Lab Invest **92**(8): 1213-1233.
- Robinson, D., Q. Hamid, et al. (1993). "Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma." J Allergy Clin Immunol **92**(2): 313-324.
- Rockstrom, M. D., L. Chen, et al. (2018). "Tumor necrosis factor alpha in sleep regulation." Sleep Med Rev **40**: 69-78.
- Romanovsky, A. A., N. Sugimoto, et al. (2003). "The organum vasculosum laminae terminalis in immune-to-brain febrigenic signaling: a reappraisal of lesion experiments." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **285**(2): R420-428.
- Rosadini, C. V. and J. C. Kagan (2017). "Early innate immune responses to bacterial LPS." Curr Opin Immunol **44**: 14-19.
- Rosas-Ballina, M., M. Ochani, et al. (2008). "Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(31): 11008-11013.
- Rosbash, M. and J. C. Hall (1989). "The molecular biology of circadian rhythms." Neuron **3**(4): 387-398.
- Roth, J., E. M. Harre, et al. (2004). "Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs." Front Biosci **9**: 290-300.
- Ruis, J. F., W. J. Rietveld, et al. (1991). "Properties of parametric photic entrainment of circadian rhythms in the rat." Physiol Behav **50**(6): 1233-1239.
- Rumbus, Z., R. Matics, et al. (2017). "Fever Is Associated with Reduced, Hypothermia with Increased Mortality in Septic Patients: A Meta-Analysis of Clinical Trials." PLoS One **12**(1): e0170152.

- Sabio, G. and R. J. Davis (2014). "TNF and MAP kinase signalling pathways." Semin Immunol **26**(3): 237-245.
- Sadki, A., M. Bentivoglio, et al. (2007). "Suppressors, receptors and effects of cytokines on the aging mouse biological clock." Neurobiol Aging **28**(2): 296-305.
- Saito, H., E. R. Sherwood, et al. (2003). "Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis." Mech Ageing Dev **124**(10-12): 1047-1058.
- Sato, S., T. Sakurai, et al. (2014). "A circadian clock gene, Rev-erbalpha, modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of Ccl2 expression." J Immunol **192**(1): 407-417.
- Scheer, F. A., C. Pirovano, et al. (2005). "Environmental light and suprachiasmatic nucleus interact in the regulation of body temperature." Neuroscience **132**(2): 465-477.
- Scheiermann, C., Y. Kunisaki, et al. (2012). "Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues." Immunity **37**(2): 290-301.
- Schein, R. M., C. L. Sprung, et al. (1990). "Plasma cortisol levels in patients with septic shock." Crit Care Med **18**(3): 259-263.
- Schernhammer, E. S., F. Laden, et al. (2003). "Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study." J Natl Cancer Inst **95**(11): 825-828.
- Schindler, C. W., B. R. Gramling, et al. (2017). "Synthetic cannabinoids found in "spice" products alter body temperature and cardiovascular parameters in conscious male rats." Drug Alcohol Depend **179**: 387-394.
- Schneiders, J., F. Fuchs, et al. (2015). "The transcription factor nuclear factor interleukin 6 mediates pro- and anti-inflammatory responses during LPS-induced systemic inflammation in mice." Brain Behav Immun **48**: 147-164.
- Schwartz, W. J. and P. Zimmerman (1990). "Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains." J Neurosci **10**(11): 3685-3694.
- Serhan, C. N., N. Chiang, et al. (2014). "Lipid mediators in the resolution of inflammation." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(2): a016311.
- Seymour, C. W., T. D. Rea, et al. (2012). "Severe sepsis in pre-hospital emergency care: analysis of incidence, care, and outcome." Am J Respir Crit Care Med **186**(12): 1264-1271.
- Shearer, W. T., J. M. Reuben, et al. (2001). "Soluble TNF-alpha receptor 1 and IL-6 plasma levels in humans subjected to the sleep deprivation model of spaceflight." J Allergy Clin Immunol **107**(1): 165-170.
- Shimomura, K., S. S. Low-Zeddies, et al. (2001). "Genome-wide epistatic interaction analysis reveals complex genetic determinants of circadian behavior in mice." Genome Res **11**(6): 959-980.
- Shinagawa, K. and M. Kojima (2003). "Mouse model of airway remodeling: strain differences." Am J Respir Crit Care Med **168**(8): 959-967.
- Shuboni, D. D., S. L. Cramm, et al. (2015). "Acute effects of light on the brain and behavior of diurnal *Arvicantis niloticus* and nocturnal *Mus musculus*." Physiol Behav **138**: 75-86.
- Sica, A., M. Erreni, et al. (2015). "Macrophage polarization in pathology." Cell Mol Life Sci **72**(21): 4111-4126.
- Silkoff, P. E. and R. J. Martin (1998). "Pathophysiology of nocturnal asthma." Ann Allergy Asthma Immunol **81**(5): 378-383; quiz 384-377.

- Silver, A. C., A. Arjona, et al. (2012). "Circadian expression of clock genes in mouse macrophages, dendritic cells, and B cells." Brain Behav Immun **26**(3): 407-413.
- Silver, A. C., A. Arjona, et al. (2012). "The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity." Immunity **36**(2): 251-261.
- Silvestri, M., L. Serpero, et al. (2006). "Cytokine-activated bronchial epithelial cell pro-inflammatory functions are effectively downregulated in vitro by ciclesonide." Pulm Pharmacol Ther **19**(3): 210-217.
- Sindrilaru, A., T. Peters, et al. (2011). "An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice." J Clin Invest **121**(3): 985-997.
- Singer, M. (2016). "The new sepsis consensus definitions (Sepsis-3): the good, the not-so-bad, and the actually-quite-pretty." Intensive Care Med **42**(12): 2027-2029.
- Singh, A. K. and Y. Jiang (2004). "How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats?" Toxicology **201**(1-3): 197-207.
- Singru, P. S., E. Sanchez, et al. (2008). "Mitogen-activated protein kinase contributes to lipopolysaccharide-induced activation of corticotropin-releasing hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus." Endocrinology **149**(5): 2283-2292.
- Socher, S. H., A. Friedman, et al. (1988). "Recombinant human tumor necrosis factor induces acute reductions in food intake and body weight in mice." J Exp Med **167**(6): 1957-1962.
- Song, Z., Y. Song, et al. (2012). "Genetic variation in the TNF gene is associated with susceptibility to severe sepsis, but not with mortality." PLoS One **7**(9): e46113.
- Stahn, C. and F. Buttgerit (2008). "Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids." Nat Clin Pract Rheumatol **4**(10): 525-533.
- Stefflerl, A., S. J. Hopkins, et al. (1996). "The role of TNF-alpha in fever: opposing actions of human and murine TNF-alpha and interactions with IL-beta in the rat." Br J Pharmacol **118**(8): 1919-1924.
- Steiner, A. A., A. Y. Molchanova, et al. (2011). "The hypothermic response to bacterial lipopolysaccharide critically depends on brain CB1, but not CB2 or TRPV1, receptors." J Physiol **589**(Pt 9): 2415-2431.
- Stephan, F. K. and I. Zucker (1972). "Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(6): 1583-1586.
- Stevens, R. G. (2005). "Circadian disruption and breast cancer: from melatonin to clock genes." Epidemiology **16**(2): 254-258.
- Stewart, C. R., J. P. Landseadel, et al. (2010). "Hypothermia increases interleukin-6 and interleukin-10 in juvenile endotoxemic mice." Pediatr Crit Care Med **11**(1): 109-116.
- Stores, G., A. J. Ellis, et al. (1998). "Sleep and psychological disturbance in nocturnal asthma." Arch Dis Child **78**(5): 413-419.
- Straif, K., R. Baan, et al. (2007). "Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting." Lancet Oncol **8**(12): 1065-1066.
- Su, W. and X. Ding (2015). "Methods of Endotoxin Detection." J Lab Autom **20**(4): 354-364.



- Sujino, M., K. H. Masumoto, et al. (2003). "Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice." Curr Biol **13**(8): 664-668.
- Sutherland, E. R. (2005). "Nocturnal asthma." J Allergy Clin Immunol **116**(6): 1179-1186; quiz 1187.
- Sutherland, E. R. (2005). "Nocturnal asthma: underlying mechanisms and treatment." Curr Allergy Asthma Rep **5**(2): 161-167.
- Sutherland, E. R., M. C. Ellison, et al. (2003). "Elevated serum melatonin is associated with the nocturnal worsening of asthma." J Allergy Clin Immunol **112**(3): 513-517.
- Sutherland, E. R., R. J. Martin, et al. (2002). "Immunomodulatory effects of melatonin in asthma." Am J Respir Crit Care Med **166**(8): 1055-1061.
- Swanson, G. R. and H. J. Burgess (2017). "Sleep and Circadian Hygiene and Inflammatory Bowel Disease." Gastroenterol Clin North Am **46**(4): 881-893.
- Szafran, B., A. Borazjani, et al. (2015). "Lipopolysaccharide suppresses carboxylesterase 2g activity and 2-arachidonoylglycerol hydrolysis: A possible mechanism to regulate inflammation." Prostaglandins Other Lipid Mediat **121**(Pt B): 199-206.
- Takahashi, S., S. Yokota, et al. (2001). "Physical and inflammatory stressors elevate circadian clock gene mPer1 mRNA levels in the paraventricular nucleus of the mouse." Endocrinology **142**(11): 4910-4917.
- Takehara, K., T. Murakami, et al. (2017). "Evaluation of the effect of recombinant thrombomodulin on a lipopolysaccharide-induced murine sepsis model." Exp Ther Med **13**(6): 2969-2974.
- Tan, C. L. and Z. A. Knight (2018). "Regulation of Body Temperature by the Nervous System." Neuron **98**(1): 31-48.
- Thompson, W. L. and L. J. Van Eldik (2009). "Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes [corrected]." Brain Res **1287**: 47-57.
- Tokizawa, K., Y. Uchida, et al. (2009). "Thermoregulation in the cold changes depending on the time of day and feeding condition: physiological and anatomical analyses of involved circadian mechanisms." Neuroscience **164**(3): 1377-1386.
- Tomasdottir, V., A. Vikingsson, et al. (2014). "Murine antigen-induced inflammation--a model for studying induction, resolution and the adaptive phase of inflammation." J Immunol Methods **415**: 36-45.
- Tracey, K. J., Y. Fong, et al. (1987). "Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia." Nature **330**(6149): 662-664.
- Tracey, K. J., S. F. Lowry, et al. (1988). "Cachectin/TNF mediates the pathophysiological effects of bacterial endotoxin/lipopolysaccharide (LPS)." Prog Clin Biol Res **272**: 77-88.
- Tsao, N., H. P. Hsu, et al. (2001). "Tumour necrosis factor-alpha causes an increase in blood-brain barrier permeability during sepsis." J Med Microbiol **50**(9): 812-821.
- Turcotte, C., F. Chouinard, et al. (2015). "Regulation of inflammation by cannabinoids, the endocannabinoids 2-arachidonoyl-glycerol and arachidonoyl-ethanolamide, and their metabolites." J Leukoc Biol **97**(6): 1049-1070.

- Turnbull, A. V. and C. L. Rivier (1999). "Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action." Physiol Rev **79**(1): 1-71.
- Turner, M. D., B. Nedjai, et al. (2014). "Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease." Biochim Biophys Acta **1843**(11): 2563-2582.
- Turrin, N. P., D. Gayle, et al. (2001). "Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide." Brain Res Bull **54**(4): 443-453.
- Turvey, S. E. and D. H. Broide (2010). "Innate immunity." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S24-32.
- Uchida, Y., K. Tokizawa, et al. (2014). "Characteristics of activated neurons in the suprachiasmatic nucleus when mice become hypothermic during fasting and cold exposure." Neurosci Lett **579**: 177-182.
- Utsuyama, M. and K. Hirokawa (2002). "Differential expression of various cytokine receptors in the brain after stimulation with LPS in young and old mice." Exp Gerontol **37**(2-3): 411-420.
- van der Poll, T. and S. M. Opal (2008). "Host-pathogen interactions in sepsis." Lancet Infect Dis **8**(1): 32-43.
- Van Hove, C. L., T. Maes, et al. (2009). "Comparison of acute inflammatory and chronic structural asthma-like responses between C57BL/6 and BALB/c mice." Int Arch Allergy Immunol **149**(3): 195-207.
- van Keimpema, A. R., M. Ariaansz, et al. (1995). "Subjective sleep quality and mental fitness in asthmatic patients." J Asthma **32**(1): 69-74.
- Van Keimpema, A. R., M. Ariaansz, et al. (1997). "Nocturnal waking and morning dip of peak expiratory flow in clinically stable asthma patients during treatment. Occurrence and patient characteristics." Respiration **64**(1): 29-34.
- Vilcek, J. and T. H. Lee (1991). "Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions." J Biol Chem **266**(12): 7313-7316.
- Villanueva, A., S. M. Yilmaz, et al. (2009). "Central cannabinoid 1 receptor antagonist administration prevents endotoxic hypotension affecting norepinephrine release in the preoptic anterior hypothalamic area." Shock **32**(6): 614-620.
- Vitaterna, M. H., D. P. King, et al. (1994). "Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior." Science **264**(5159): 719-725.
- Voll, R. E., M. Herrmann, et al. (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." Nature **390**(6658): 350-351.
- Wadsworth, S. J., R. Atsuta, et al. (2010). "IL-13 and TH2 cytokine exposure triggers matrix metalloproteinase 7-mediated Fas ligand cleavage from bronchial epithelial cells." J Allergy Clin Immunol **126**(2): 366-374, 374 e361-368.
- Wahab, F., N. N. Santos-Junior, et al. (2016). "Interleukin-1 Receptor Antagonist Decreases Hypothalamic Oxidative Stress During Experimental Sepsis." Mol Neurobiol **53**(6): 3992-3998.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.

- Wang, A., Z. Wang, et al. (2015). "CCL2/CCR2-dependent recruitment of Th17 cells but not Tc17 cells to the lung in a murine asthma model." Int Arch Allergy Immunol **166**(1): 52-62.
- Wang, C. Y., M. J. Hsieh, et al. (2016). "CLOCK modulates survival and acute lung injury in mice with polymicrobial sepsis." Biochem Biophys Res Commun **478**(2): 935-941.
- Wang, J., Y. Luo, et al. (2015). "Clock-controlled StAR's expression and corticosterone production contribute to the endotoxemia immune response." Chronobiol Int **32**(3): 358-367.
- Wang, Y., Y. Liu, et al. (2001). "Simultaneous measurement of anandamide and 2-arachidonoylglycerol by polymyxin B-selective adsorption and subsequent high-performance liquid chromatography analysis: increase in endogenous cannabinoids in the sera of patients with endotoxic shock." Anal Biochem **294**(1): 73-82.
- Wanner, S. P., K. Yoshida, et al. (2013). "Lipopolysaccharide-induced neuronal activation in the paraventricular and dorsomedial hypothalamus depends on ambient temperature." PLoS One **8**(9): e75733.
- Warner, E. A. and L. L. Moldawer (2008). "Using innate immunity to characterize the host response to microbial invasion in severe sepsis." Future Microbiol **3**(2): 177-189.
- Webb, D. C., A. N. McKenzie, et al. (2000). "Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity." J Immunol **165**(1): 108-113.
- Weber, A., P. Wasiliew, et al. (2010). "Interleukin-1 (IL-1) pathway." Sci Signal **3**(105): cm1.
- Wegmann, M. and H. Renz (2005). "Animal models of experimental asthma." Ernst Schering Res Found Workshop(50): 69-87.
- Welsh, D. K., D. E. Logothetis, et al. (1995). "Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms." Neuron **14**(4): 697-706.
- Welsh, D. K., S. H. Yoo, et al. (2004). "Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression." Curr Biol **14**(24): 2289-2295.
- Witting, W., I. H. Kwa, et al. (1990). "Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease." Biol Psychiatry **27**(6): 563-572.
- Wu, M., W. Chen, et al. (2018). "Celastrol aggravates LPS-induced inflammation and injuries of liver and kidney in mice." Am J Transl Res **10**(7): 2078-2086.
- Xia, M. X., X. Ding, et al. (2014). "Inhaled budesonide protects against chronic asthma-induced neuroinflammation in mouse brain." J Neuroimmunol **273**(1-2): 53-57.
- Xu, R. B., Z. M. Liu, et al. (1991). "A study on the circadian rhythm of glucocorticoid receptor." Neuroendocrinology **53 Suppl 1**: 31-36.
- Xu, Y., Q. S. Padiath, et al. (2005). "Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome." Nature **434**(7033): 640-644.
- Yamashita, H., M. Ishikawa, et al. (2017). "Interleukin-18 Reduces Blood Glucose and Modulates Plasma Corticosterone in a Septic Mouse Model." Shock **47**(4): 455-462.
- Yan, L., I. Karatsoreos, et al. (2007). "Exploring spatiotemporal organization of SCN circuits." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **72**: 527-541.

- Yan, L. and H. Okamura (2002). "Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus." Eur J Neurosci **15**(7): 1153-1162.
- Yao, Y. and S. E. Tsirka (2014). "Monocyte chemoattractant protein-1 and the blood-brain barrier." Cell Mol Life Sci **71**(4): 683-697.
- Yeh, C. T., M. C. Kao, et al. (2015). "Platonin preserves blood-brain barrier integrity in septic rats." Acta Anaesthesiol Taiwan **53**(1): 12-15.
- Yokoo, H., S. Chiba, et al. (2012). "Neurodegenerative evidence in mice brains with cecal ligation and puncture-induced sepsis: preventive effect of the free radical scavenger edaravone." PLoS One **7**(12): e51539.
- Yoo, S. H., S. Yamazaki, et al. (2004). "PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(15): 5339-5346.
- Yoshida, K., A. Hashiramoto, et al. (2013). "TNF-alpha modulates expression of the circadian clock gene Per2 in rheumatoid synovial cells." Scand J Rheumatol **42**(4): 276-280.
- Yoshida, K., A. Nakai, et al. (2018). "TNF-alpha induces expression of the circadian clock gene Bmal1 via dual calcium-dependent pathways in rheumatoid synovial cells." Biochem Biophys Res Commun **495**(2): 1675-1680.
- Yoshida, K., C. Wakai, et al. (2005). "A new high-temperature multinuclear-magnetic-resonance probe and the self-diffusion of light and heavy water in sub- and supercritical conditions." J Chem Phys **123**(16): 164506.
- Young, M. W. (1996). "The Drosophila genes timeless and period collaborate to promote cycles of gene expression composing a circadian pacemaker." Prog Brain Res **111**: 29-39.
- Yue, Y., Y. Wang, et al. (2015). "A central role for the mammalian target of rapamycin in LPS-induced anorexia in mice." J Endocrinol **224**(1): 37-47.
- Zhang, L. and C. C. Wang (2014). "Inflammatory response of macrophages in infection." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **13**(2): 138-152.
- Zhang, Q. H. and Y. M. Yao (2010). "[Neuroendocrine dysfunction in sepsis and its therapeutic strategy]." Zhonghua Shao Shang Za Zhi **26**(2): 87-89.
- Zhao, Z. D., W. Z. Yang, et al. (2017). "A hypothalamic circuit that controls body temperature." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(8): 2042-2047.
- Zhu, X. M., Y. M. Yao, et al. (2009). "Effect of high mobility group box-1 protein on apoptosis of peritoneal macrophages." Arch Biochem Biophys **492**(1-2): 54-61.
- Zweigner, J., H. J. Gramm, et al. (2001). "High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes." Blood **98**(13): 3800-3808.