



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**Evaluación de la actividad neuronal inducida por la
administración de Lipopolisacárido como una herramienta
para estudiar la comunicación entre el sistema inmune y el
cerebro**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A:

JOSELYN GARCÍA CORONA

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. RUDOLF MARINUS BUIJS**

CIUDAD DE MEXICO, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Lista de abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| AP | Área Postrema |
| BHE | Barrera hematoencefálica |
| CVOs | Órganos circunventriculares |
| DMV | Núcleo Motor Dorsal del vago |
| EM | Eminencia Media |
| GABA | Ácido gamma aminobutírico |
| IFN γ | Interferón γ |
| IGL | Hojuela intergeniculada |
| IR | Inmunoreactividad |
| IL-1 β | Interleucina 1 beta |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| I.V. | Vía intravenosa |
| LD | Luz-obscuridad |
| LPS | Lipopolisacárido |
| NPY | Células productoras de neuropéptido Y |
| NSQ | Núcleo Supraquiasmático |
| NTS | Núcleo del Tracto Solitario |
| SFO | Órgano Subfornical |
| SNA | Sistema Nervioso Autónomo |
| OVLТ | Órgano Vasculoso de la Lámina Terminalis |
| PAMPs | Patrones moleculares asociados al patógeno |
| PGN | Peptidoglicano |
| PVN | Núcleo paraventricular hipotalámico |
| TLR4 | Receptor 4 del tipo Toll |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| TrHip | Tracto retino hipotalámico |
| VP | Vasopresina |
| ZT | Tiempo Zeitgeber |

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN | 5 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 6 |
| 2.1 Ritmos biológicos..... | 6 |
| 2.2 Tipos de ritmos..... | 6 |
| 2.3 El sistema circadiano..... | 7 |
| 2.3.1 Vías de sincronización..... | 8 |
| 2.3.2 El Núcleo Supraquiasmático (NSQ)..... | 5 |
| 2.3.3 Vías de salida..... | 10 |
| 2.3.4 Ritmos circadianos en el sistema inmune..... | 11 |
| 2.4 El sistema inmune | 12 |
| 2.4.1 Respuesta inmune innata..... | 13 |
| 2.4.2 Respuesta inmune adaptativa..... | 14 |
| 2.4.3 Lipopolisacárido..... | 11 |
| 2.5 Comunicación entre el sistema inmune y el cerebro..... | 15 |
| 2.5.1 Citocinas en el cerebro..... | 16 |
| 2.6 Comunicación entre el cerebro y el sistema inmune..... | 19 |
| 2.6.1 Sistema nervioso autónomo..... | 19 |
| 2.6.2 Sistema nervioso parasimpático..... | 20 |
| 2.6.3 Sistema nervioso simpático..... | 20 |
| 3.Planteamiento del problema | 21 |
| 4. Objetivos | 22 |
| 5. Hipótesis | 23 |
| 6. Variables | 24 |
| 7.Materiales y método | 24 |
| 7.1 Animales y condiciones generales..... | 24 |
| 7.2 Procedimiento quirúrgico para la inserción de la cánula yugular.... | 25 |
| 7.3 Estímulo inmunológico..... | 25 |
| 7.4 Evaluación de la cantidad de actividad neuronal | 27 |
| 7.5 Inmunohistoquímica..... | 27 |

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| 7.6 Conteo celular | 28 |
| 8. Análisis estadístico..... | 29 |
| 9. Resultados..... | 29 |
| 10. Discusión..... | 40 |
| 11. Conclusiones..... | 46 |

1. RESUMEN

El cerebro vigila de forma constante la homeostasis del organismo. La información acerca del estado inmunológico del cuerpo puede llegar al cerebro a través de la vía humoral, la vía neural o a través de ambas. Por otra parte, se sabe que el sistema inmune puede ser influenciado por el cerebro y esto comienza a ser visible, por ejemplo, cuando el sistema inmune presenta variaciones circadianas en cuanto a la cantidad y funcionalidad de sus componentes, lo que hace suponer que el sistema circadiano, liderado por el Núcleo Supraquiasmático del hipotálamo (NSQ), coordina la actividad del sistema inmune. La hipótesis de este trabajo fue que la información acerca del estado inmunológico del cuerpo llega al cerebro por diferentes vías dependiendo de la magnitud del reto inmune, así como de la hora del día a la que éste es administrado y que el NSQ recibe información de retroalimentación del sistema inmune. El objetivo fue investigar las vías de comunicación entre el sistema inmune y el NSQ. Después de administrar vía intravenosa (i.v) un estímulo inmunológico moderado de Lipopolisacárido (LPS) 0.002 µg/kg y 1.6 µg/kg en dos diferentes horas del día (una durante la fase de luz, denominada "ZT2", y la otra durante la fase de oscuridad, "ZT14") a ratas macho de la cepa Wistar, se evaluó la actividad neuronal del Núcleo del Tracto Solitario (como núcleo representante de la vía neural), el Área Postrema (como representante de la vía humoral) y del NSQ (como representante del sistema circadiano) utilizando la técnica de inmunohistoquímica para la proteína de c-Fos, la cual es un producto del gen de reacción inmediata. Nuestros resultados indican que la dosis de 0.002 µg/kg de LPS administrado en ZT2, activa la vía neural y ambas vías cuando se administra en ZT14, mientras que la dosis de 1.6 µg/kg de LPS activa ambas vías en los dos puntos temporales.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la vía de transmisión de las señales inmunes desde la periferia hacia el cerebro depende de la magnitud del reto inmune, así como del momento del día en el cual éste es administrado.

2. INTRODUCCIÓN

El planeta gira sobre su eje y de acuerdo a su posición con respecto al Sol presenta dos ambientes bien definidos: la luz y la oscuridad. Debido a que el eje de rotación de la tierra está inclinado, la duración relativa de los periodos de luz y oscuridad cambia sistemáticamente durante el año. Como consecuencia del proceso evolutivo, los seres vivos han respondido a esta situación geofísica desarrollando mecanismos específicos de predicción del tiempo con el fin de adaptarse exitosamente a los cambios diarios y estacionales (Cardinali y Bernasconi, 2009).

2.1 RITMOS BIOLÓGICOS

Un ritmo biológico es la recurrencia de un fenómeno biológico en intervalos regulares de tiempo. Los ritmos biológicos tienen un carácter hereditario, lo cual le permite al organismo estimar el paso del tiempo para así poder anticipar y prepararse para las demandas que surgen de los cambios ambientales necesarios para su supervivencia (Salgado et al., 2009).

2.2 TIPOS DE RITMOS

En la naturaleza se observan diversos ritmos biológicos; aquellos con una periodicidad menor a 24 horas se denominan *ultradianos*, como son: el consumo de alimentos, el ritmo cardiaco, los ritmos de actividad cerebral. Los ritmos biológicos con una periodicidad mayor a un día se denominan *infradianos*, como es el caso del ciclo menstrual, el ciclo estral, la hibernación, entre otros.

Por su parte, los ritmos biológicos con una periodicidad cercana a las 24 horas se conocen como *circadianos*, por ejemplo: el ciclo sueño-vigilia y la liberación de ciertas hormonas. Algunos ejemplos de ritmos clasificados en este criterio se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Periodo de los ritmos biológicos clasificados de acuerdo a su frecuencia

| Tipo de ritmo | Periodo | Ejemplo |
|---------------|----------|---|
| Ultradiano | 1 seg | Actividad marcapaso del corazón |
| | 6 seg | Ritmo respiratorio autónomo |
| | 90 min | Alternancia de estados de sueños |
| Circadiano | 24 horas | Ciclo sueño-vigilia Temperatura corporal |
| Infradiano | 28 días | Ciclo menstrual |
| | 365 días | Hibernación |

Los ritmos circadianos (del latín, circa “alrededor”, diem “día”= alrededor de un día) son una propiedad conservada en todos los seres vivos, desde organismos unicelulares procariontes hasta mamíferos y plantas superiores (Hernández y Santiago 2010). Se sabe que son generados de manera endógena porque cuando el organismo es sometido a condiciones ambientales constantes, estas fluctuaciones no desaparecen (Cardinali y Bernasconi, 2009).

Normalmente los ritmos circadianos se encuentran sincronizados al ciclo luz-obscuridad, esta sincronización se da por la participación de señales externas que oscilan, denominados *Zeitgebers* (palabra alemana que significa “indicadores de tiempo”) y que por su relevancia sincronizan la actividad y ciertas funciones del organismo con el medio ambiente circundante. El *Zeitgeber* primario para los humanos es el ciclo luz-oscuridad (Maldonado et al., 2011), sin embargo, en ausencia de esta señal sincronizadora, se manifiestan los ritmos de forma endógena, en libre curso o “free running”. Esto quiere decir que, sin estar sincronizado a ninguna señal ambiental, el reloj circadiano (localizado en el Núcleo Supraquiasmático del hipotálamo (NSQ) es capaz de generar ritmos con un periodo aproximado de 24 horas (Castellanos et al., 2002).

2.3 EL SISTEMA CIRCADIANO

El sistema circadiano se encuentra constituido por 3 componentes esenciales:

- Una vía de sincronización
- El reloj maestro (el NSQ en mamíferos)
- Vías eferentes que acoplan el reloj a sistemas efectores que expresan las funciones circadianas o ritmo.

2.3.1 VÍAS DE SINCRONIZACIÓN

Siendo la luz el sincronizador más potente en los mamíferos (zeitgeber), una de las principales vías de entrada de información nerviosa sensorial al NSQ procede de la retina, donde la cantidad de luminiscencia que hay en el ambiente es codificada por un tipo especializado de células foto-receptoras, las cuales transmiten la información a un tipo de neuronas denominadas “células ganglionares tipo W”. Los axones de estas neuronas ganglionares forman el denominado Tracto retino hipotalámico (TrHip; Castellanos et al., 2002).

En 1972 Moore y Lenn demostraron que el TrHip proyecta al NSQ, principalmente a la división ventrolateral, por lo que también se le ha llamado a esta región “zona retino recipiente” (Castellanos et al., 2002).

El TrHip también proyecta de forma importante a la hojuela intergeniculada (IGL) del tálamo (Pickard 1985). La IGL recibe también innervación en forma bilateral tanto de la retina como del tallo cerebral, principalmente de núcleos productores de adrenalina (locus coeruleus), serotonina (Rafé), acetilcolina (núcleo basal magnocelular) y del área retroquiasmática (Moore y Card 1994) y está constituida por una población de células productoras de neuropéptido Y (NPY) y ácido gamma aminobutírico (GABA; Moore y Speh 1993). La IGL y el área retroquiasmática no se encuentran involucradas con los mecanismos visuales, pero proyectan en forma directa a la porción ventrolateral del NSQ (Card y Moore, 1989).

Se ha acuñado una terminología que tiene como referencia el momento en el que inicia la fase de luz, al cual se le denomina ZT0 (ZT). Para lo cual cada hora del día a partir de este ZT0 se va denominando ZT1, ZT2, hasta ZT24, momento en el cual, se cumple el ciclo de luz-obscuridad.

2.3.2 EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO (NSQ)

En los mamíferos, los ritmos circadianos son generados por un reloj biológico central, localizado en una estructura hipotalámica llamada Núcleo Supraquiasmático; además la maquinaria molecular está integrada por genes de reloj que se expresan en diversos tejidos, y en algunos de ellos se expresan como osciladores periféricos de ser controlados por genes reloj localizados en las células de diversos tejidos, conocidos como osciladores periféricos (Reppert y Weaver, 2002).

El NSQ en los mamíferos es un núcleo par de forma ovoide, localizado en la región antero-ventral del hipotálamo, arriba del quiasma óptico, lateral a la base del tercer ventrículo y se sitúa por debajo de la zona subparaventricular, por detrás del área preóptica medial por delante del área retroquiasmática y lateralmente se relaciona con la zona lateral anterior del hipotálamo (Castellanos et al., 2002).

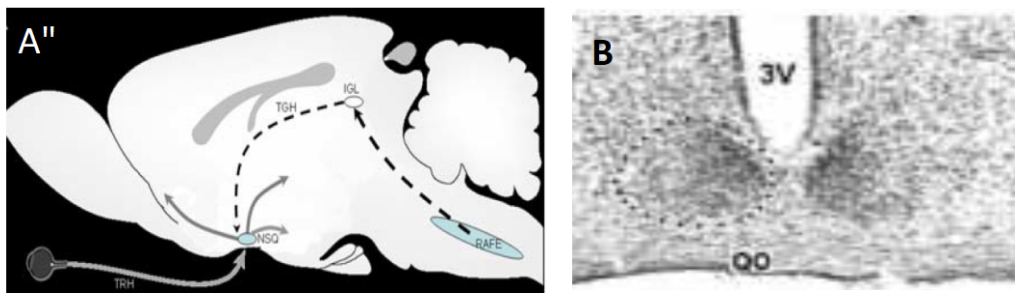


Figura 1. (A) Localización del Núcleo Supraquiasmático, corte sagital de una rata (B) El NSQ está localizado en la región antero-ventral del hipotálamo arriba del quiasma óptico, lateral a la base del tercer ventrículo (3V), se sitúa por debajo de la zona subparaventricular, por detrás del área preóptica medial, por delante de la retroquiasmática. (Tomada de Castellanos et al., 2002).

El NSQ se ha dividido anatómicamente en: región ventrolateral y región dorsomedial (Figura 1). La región ventrolateral se localiza sobre el quiasma óptico, es retino receptiva, mientras que la zona dorsal se ha asociado más con funciones de

generación y transmisión de la señal de tiempo o de la periodicidad circadiana hacia el resto del cerebro (Castellanos et al., 2002).

De acuerdo a sus características neuroquímicas, el NSQ también se ha dividido en regiones específicas. Las neuronas del NSQ contienen GABA y glutamato, además de péptidos como la vasopresina (VP), el cual se encuentra en la región dorsomedial del NSQ (Vandesande y Dierick 1975) y el péptido vasoactivo intestinal (VIP), producido específicamente en las neuronas de la región ventrolateral (Buijs et al., 2006).

2.3.3 VÍAS DE SALIDA

Para poder transmitir su señal de tiempo al organismo, el NSQ necesita de otras estructuras; las principales proyecciones neuronales provenientes del NSQ se comunican hacia diversas zonas del hipotálamo, tal es el caso del núcleo paraventricular hipotalámico (PVN), que controla la actividad circadiana de la actividad del eje adrenocorticotrópico, así como el control del ritmo de la hormona melatonina producida por la glándula pineal a través de sus proyecciones hacia el sistema nervioso autónomo (Buijs y Kalsbeek 2001). A través del núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH) se mantiene el control del ciclo sueño –vigilia y de alimentación a través de su interacción con el sistema orexigénico en el hipotálamo lateral (Schwarz y Bilbo 2012). Por otra parte, también se ha demostrado la importancia del sistema nervioso autónomo como una vía de salida del reloj hacia los tejidos periféricos manteniéndolos acoplados al reloj central (Buijs y Kalsbeek, 2001).

A través de estas vías de salida, el NSQ es capaz de mantener un orden temporal en diversos sistemas del cuerpo, por ejemplo, en el sistema hormonal, en el digestivo y en el inmune. En la presente tesis nos enfocaremos a este último.

2.3.4 RITMOS CIRCADIANOS EN EL SISTEMA INMUNE

La ritmicidad circadiana también se observa en el sistema inmune; diversos estudios han descrito variaciones circadianas en parámetros tales como la proliferación de linfocitos, la presentación antigénica y la expresión de citocinas (Coogan y Wise, 2008; Du et al., 2005; Marpegan et al., 2005; Suzuki et al., 1997). Por ejemplo, el número de linfocitos, monocitos y granulocitos en la sangre de los humanos llega a tener valores máximos durante la noche y disminuye durante el día (Petrovsky y Harrison, 1998). También se han encontrados ritmos diarios en factores inmunológicos tales como: Interleucina 6 (IL-6), Factor de Necrosis Tumoral (TNF alfa), Interleucina 10 (IL-10), Interleucina 2 (IL-2), Interferones beta y alfa (Young 1995; Petrovsky 1997; Takane 2002; Arjona et al., 2004), entre otros.

Uno de los trabajos pioneros en el área de ritmos circadianos en el sistema inmune fue descrito por Franz Halberg y colaboradores (1960), quien demostró una variación circadiana en la susceptibilidad a dosis letales de lipopolisacárido (LPS), con una alta mortalidad durante el día (Fig. 3). Esta fue la primera evidencia experimental acerca de variaciones diarias de la respuesta inmune.

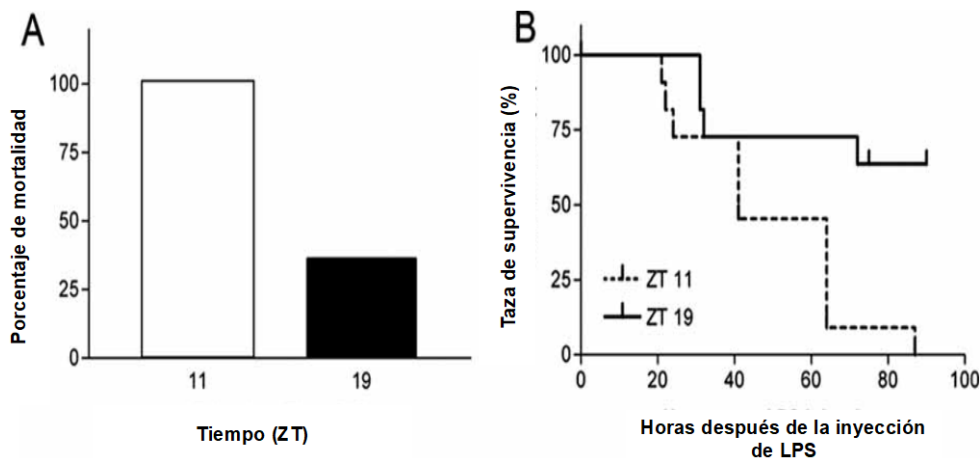


Figura 2. **Ritmo de susceptibilidad a dosis letales de Lipopolisacárido (LPS) 24-h.** La mortalidad en los ratones expuestos al LPS 20 µg/kg en LD (luz-obscuridad) y condiciones DD (oscuridad-oscuridad). (A) los ratones en condiciones LD fueron inyectados con LPS en ZT11 y ZT19. (B) El porcentaje de mortalidad fue mayor en ZT11 que en ZT19 (Tomado de Marpegan et al., 2009).

Trabajos previos en el laboratorio han demostrado que en la rata, la respuesta ante un reto inmune con LPS depende de la hora del día. La respuesta inmune innata es más alta en la noche que el día. La producción de citocinas proinflamatorias después de un reto con LPS de manera intravenosa es mayor en la noche que el día tanto en dosis bajas (1.6 mg/kg), como en dosis altas (100mg/kg) de LPS (Guerreo-Vargas et al., 2014).

Además, la administración de LPS en la fase de actividad aumenta la actividad del NSQ, la cual indica que hay una relación entre la respuesta inmune y el marcapasos maestro. ¿Cuál es la vía por la cual el NSQ recibe información ante un reto inmune?

2.4 EL SISTEMA INMUNE

Los seres vivos defienden constantemente su integridad biológica frente a agresiones procedentes tanto del exterior como del interior del organismo. Para que el fenómeno defensivo se lleve a cabo los organismos disponen de una serie de barreras naturales de aislamiento, como las mucosas y la piel, la cual es considerada como la primera barrera ante una infección (Berczi 2010). Por otra parte, también se cuenta con un sistema especializado que dispone de un conjunto de órganos, células y moléculas conocido como el sistema inmune. Este sistema tiene la capacidad de identificar y destruir todos los agentes extraños que invaden al organismo e incluso aquello que pertenece al organismo pero que se ha deteriorado. En el caso de una infección bacteriana, tan pronto como la bacteria entra al cuerpo ésta se confronta con dos líneas de defensa: la defensa innata (natural, no específica) y la defensa adaptativa (adquirida, específica; interleucinas; Abbas et al., 2007).

Uno de los componentes importantes en estas líneas de defensa son las citocinas; las cuales son proteínas o glicoproteínas solubles de bajo peso molecular (30 kDa) que actúan como mensajeros y llevan información de una célula a otra. Son secretadas por una gran variedad de células y no son exclusivas del sistema inmunitario, además, son capaces de regular la intensidad y duración de la respuesta inmunitaria a través de sus propiedades autocrinas. Muchas citocinas son sintetizadas por algunos leucocitos (por ejemplo, los macrófagos o linfocitos T) y actúan sobre otros leucocitos, a éstas se les denomina interleucinas (Abbas et al., 2007).

2.4.1 RESPUESTA INMUNE INNATA

La inmunidad innata, mejor conocida como la primera línea de defensa, es el conjunto de mecanismos que actúan contra todos los microorganismos patógenos desde el primer contacto. Este tipo de inmunidad tiene gran similitud en todos los vertebrados y es de acción rápida e inespecífica.

El reconocimiento de cualquier agente patógeno se lleva a cabo través de receptores presentes en las células inmunes, los cuales se unen a estructuras altamente conservadas presentes en los microorganismos. Estas estructuras se conocen con el nombre de patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs). Los ejemplos más conocidos de PAMPs son: el lipopolisacárido bacteriano (LPS), el peptidoglicano (PGN) y el ADN bacteriano (Anderson 2000).

La respuesta innata es mayormente orquestada por macrófagos, neutrófilos y otras moléculas fagocíticas (Schwarz y Bilbo, 2012) los cuales poseen los receptores específicos que reconocen a los ya mencionados PAMPs. La respuesta inmune innata se encuentra caracterizada por la producción inmediata de citocinas por las células inmunitarias.

2.4.2 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

La respuesta adaptativa es manejada por componentes específicos de la bacteria o el antígeno, requiere de varios días para desarrollarse y genera memoria inmunológica, es decir, cuando hay una segunda exposición al mismo antígeno el resultado es una respuesta acelerada y específica (Berczi 1998). El sistema inmune adaptativo es llamado así porque se adapta o “aprende” a reconocer tipos específicos de patógenos (Berczi 2010).

La respuesta adaptativa es orquestada principalmente por linfocitos, quienes se originan en la médula ósea y otros tejidos hematopoyéticos en los mamíferos, después migran y maduran en el timo o en la médula ósea. Los linfocitos se han clasificado en células T (derivadas del timo) y en células B (derivadas de la médula ósea). Después de la maduración de las células T y B a través de la circulación sanguínea y en la linfa, migran hacia los órganos inmunes secundarios como el bazo y los nodos linfáticos donde reconocen a los patógenos (Rojas et al., 2007).

2.4.3 LIPOPOLISACÁRIDO

Uno de los compuestos más utilizados para inducir la respuesta inflamatoria en mamíferos es el Lipopolisacárido (LPS). El LPS es un componente inmunológicamente activo de la pared celular de las bacterias gram-negativas que es reconocido por los macrófagos y neutrófilos; esta característica permite que se genere una rápida respuesta (de minutos a horas) a las bacterias invasoras sin haber tenido una exposición previa (Berczi 1998). Su parte tóxica, el lípido A, es expuesto a las células inmunes y así evoca una respuesta inflamatoria (Berczi 1998; Rivest 2003).

El modelo de exposición al LPS induce un fenómeno global conocido como la respuesta de fase aguda, que se caracteriza por la rápida producción de proteínas de fase aguda, citocinas y la inducción de los mecanismos de la inmunidad innata,

algunos estudios han reportado que a dosis altas puede producir fiebre, que es una de las características del síndrome de la enfermedad que se observa durante la inflamación (Krueger et al., 2001).

Cuando el LPS llega al torrente sanguíneo, se une a las proteínas de unión al LPS (LBP) o septinas. El complejo recién formado tiene afinidad para unirse a los receptores CD14 localizados en la superficie de las células mieloides como monocitos, macrófagos o neutrófilos. El LPS ejerce muchos de sus efectos celulares mediante la interacción con el receptor de tipo Toll (Toll-like receptor, TLR, siendo el 4 específico para LPS; Paladino et al., 2010). La unión del LPS con su receptor específico TLR4 puede inducir la activación neuronal (evaluados por la expresión de c-Fos) en diversas regiones del cerebro (Elmqvist et al., 1996). Los TLRs se expresan principalmente en los macrófagos específicos del Sistema Nervioso Central (microglía), y han sido descritos en algunos órganos circunventriculares tales como el Órgano Vasculoso de la Lámina Terminalis (OVLT), Órgano Subfornical (SFO), Eminencia Media (EM) y el Área Postrema (AP; Laflamme y Rivest 2001; Rivest 2003).

La endotoxemia, que es generada por el LPS, induce cambios en el sistema inmune incrementando los niveles de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) y citocinas anti-inflamatorias (IL-10; Laflamme y Rivest 2001).

2.5 COMUNICACIÓN ENTRE EL SISTEMA INMUNE Y EL CEREBRO

Una de las principales observaciones que demostraron los efectos del sistema inmune sobre la función del cerebro fue el estudio de la conducta de enfermedad en respuesta a un reto para el sistema inmunológico (Schwarz y Bilbo 2012), como la presencia de un agente patógeno; que consiste en cambios en el comportamiento, incluyendo reducción de la ingesta de alimento y agua, disminución en la actividad de exploración, aumento del sueño, reducción de las interacciones sociales y sexuales, así como el aumento de la temperatura corporal (Hart 1988). Se sabe que mediante la producción de diversas citocinas pro-

inflamatorias por los macrófagos circulantes y residentes en cada tejido (hígado, bazo, timo, pulmón, etc.) se orquestan esta serie de cambios fisiológicos relacionados con la conducta de enfermedad, incluyendo cambios en el funcionamiento del sistema nervioso central (Dantzer et al., 2008).

2.5.1 CITOCINAS EN EL CEREBRO

Las citocinas tienen propiedades moduladoras dentro del cerebro durante el proceso de infección e inflamación actuando en las neuronas y en la glía. (Schwarz y Bilbo, 2012). Los receptores de las citocinas en los mamíferos se han caracterizado a lo largo del sistema nervioso central con altas concentraciones en el hipotálamo, hipocampo, amígdala, tálamo, plexo coroideo, bulbo olfatorio, cerebelo, tallo cerebral y médula espinal (Ban et al., 1993).

Las citocinas que se producen después de la administración de LPS pueden activar al cerebro a través de dos vías:

1. A través de sus receptores en la periferia que envían su señal a través del nervio vago al cerebro (vía neural).
2. A través de sus receptores en los órganos circunventriculares (vía humoral)

La vía neural Esta vía involucra a los nervios aferentes que inervan a los órganos inmunes. En el proceso de activación por la vía neural, las citocinas pro-inflamatorias que son liberadas por las células inmunes periféricas en respuesta a un reto inmunológico son captadas por sus receptores en la periferia enviando su señal al cerebro a través del nervio vago (el cual se sabe que está compuesto en un 80% por fibras aferentes; Janeway y Medzhitov, 1999; Schwarz y Bilbo, 2012). En la figura 3 podemos ver una representación de esta vía.

Las fibras aferentes del nervio vago visceral, que hacen sinapsis en el ganglio nodoso, terminan principalmente dentro del Núcleo del Tracto Solitario (NTS), el

Núcleo Motor Dorsal del vago (DMV) y el Área Postrema (AP; Blalock, 2002). El DMV es el sitio donde se inician las fibras eferentes preganglionares del vago (Hernández et al., 2007).

La vía humoral. Esta vía permite a los patrones moleculares patógenos específicos actuar sobre receptores toll-like en aquellas áreas del cerebro que están desprovistas de una barrera hematoencefálica funcional (Segura et al., 2007), las así llamadas áreas circunventriculares. La Vía humoral involucra la comunicación a través de las citocinas periféricas o los PAMP's.

La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura morfológica constituida por las células del endotelio vascular que regula el intercambio de sangre circulante y el tejido nervioso (Escobar y Gómez, 2008).

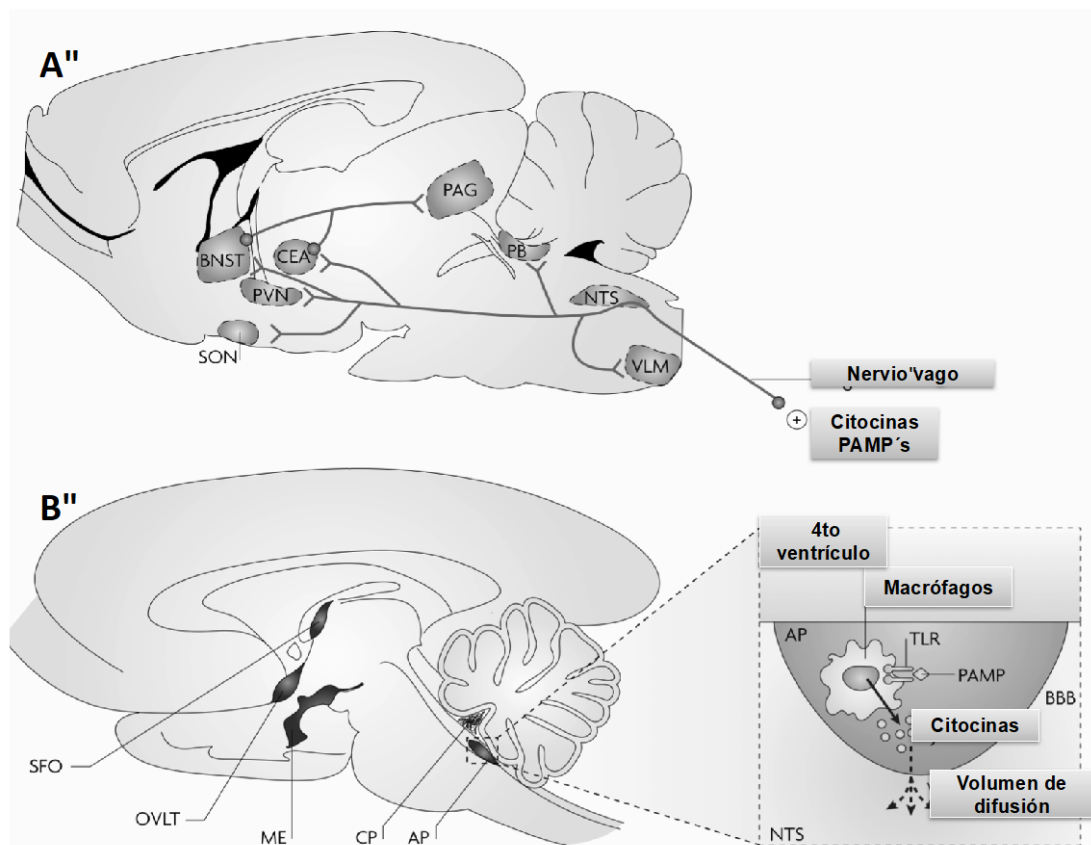


Figura 3. **Vías anatómicas de señales inmunes desde la periferia hasta el cerebro.** El cerebro y el sistema inmune se comunican a través de diferentes vías. (A) La vía neural involucra a los nervios

aferentes que inervan a los órganos inmunes, tales como el nervio vago, las proyecciones aferentes vagales van hacia el núcleo del tracto solitario (NTS), al núcleo parabraquial (PB) y el bulbo raquídeo. (B) En la vía humoral intervienen los órganos circunventriculares, en los cuales los patrones moleculares asociados al patógeno (PAMP's) inducen la producción y liberación de citocinas pro-inflamatorias por los macrófagos que expresan el receptor TLR (Tomado de Dantzer 2008).

La interacción entre el sistema inmune y el cerebro requiere de “ventanas” en la BHE; en el cerebro existen áreas cuyos capilares tienen el endotelio fenestrado, es decir, que permite el libre intercambio de moléculas entre la sangre y las neuronas. Estas áreas son conocidas como los órganos circunventriculares (CVO's) y permiten la transmisión de mediadores solubles liberados por las células inmunes en sitios precisos (Steinman 2004). Los CVO's se localizan principalmente alrededor de las cavidades ventriculares y son el Órgano Vasculoso de la Lámina Terminalis (OVLT), Órgano Subfornical (SFO), la Eminencia Media (EM), la pituitaria Posterior, la Glándula Pineal y el Área Postrema (AP; Escobar y Gómez, 2008; Joly et al., 2007; Johnson y Gross, 1993).

Las citocinas pueden ejercer sus efectos en el cerebro a través de sus receptores presentes en los CVO's; la unión de las citocinas a sus receptores específicos en estos sitios dentro del cerebro permite la transmisión de la señal hacia el hipotálamo y otros sitios del cerebro que controlan los síntomas de la enfermedad (Hansen 2001). Por lo tanto, las citocinas circulantes durante una infección son consideradas los mensajeros de la señalización del sistema inmune-cerebro en la vía humoral (Sadki et al., 2007).

Las funciones propuestas para los distintos CVOs incluyen el mantenimiento de los fluidos corporales, el equilibrio, la presión arterial, los ritmos biológicos, sueño, temperatura, respiración, balance energético, mediación de la respuesta inmune, modulación del dolor, protección contra sustancias tóxicas ingeridas, reproducción y lactancia (Joly et al 2007; Johnson y Gross, 1993).

Existen trabajos que demuestran la activación de distintos núcleos cerebrales en respuesta a un estímulo inmune, tales como los trabajos de Wuchert y colaboradores en el 2008, Laflamme y Rivest 2001 y 2003. Sin embargo, en todos ellos utilizan concentraciones altas del estímulo que dificultan la interpretación acerca de si esta activación neuronal se debe al estímulo inmune mismo o a una manifestación secundaria de uno de los efectos fisiológicos severos.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que tanto la cantidad de citocinas liberadas como los cambios en la temperatura corporal en respuesta a la administración del LPS, dependen de la hora del día a la cual se administra el estímulo. Así mismo, se observó que las lesiones bilaterales del NSQ incrementaban la respuesta inflamatoria ante el LPS, lo cual sugiere que la interacción entre este núcleo y el sistema inmune modula la intensidad de la respuesta inflamatoria (Guerrero-Vargas et al., 2014).

2.6 COMUNICACIÓN ENTRE EL CEREBRO Y EL SISTEMA INMUNE

Hoy en día se sabe que los procesos inmunitarios en el cerebro no son iguales a los que ocurren en la periferia. El cerebro tiene células inmunes residentes, como la microglía, la cual produce citocinas y presentan antígenos en respuesta a alteraciones en la homeostasis dentro del cerebro de una manera muy similar a las células inmunes de la periferia (Schwarz y Bilbo, 2012)

El cerebro puede regular directamente al sistema inmune a través de vías neurales específicas

2.6.1 SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO

El sistema nervioso autónomo se encarga de la regulación del corazón, los vasos sanguíneos, las glándulas, las vísceras y el músculo liso vascular (Brailowsky 2002). Este sistema está formado por los ganglios raquídeos y los nervios que salen y llegan de la médula, y de los ganglios, por una parte, y por otra parte está el sistema

nervioso motor que incluye los nervios que controlan los músculos esqueléticos (Brailowsky 2002).

El Sistema Nervioso Autónomo (SNA) se divide en Sistema Nervioso Simpático, la médula suprarrenal es estimulada para liberar epinefrina (adrenalina) y norepinefrina (noradrenalina), lo que a su vez aumenta el metabolismo de las células y estimula al hígado para que libere glucosa en la sangre. y Sistema Nervioso Parasimpático, cuyo transmisor es la acetilcolina; ambas ramas del SNA controlan diversos procesos inmunes que revisaremos a continuación.

2.6.2 SISTEMA NERVIOSO PARASIMPÁTICO

Estudios de Tracey y colaboradores (2002) resaltaron el papel de la vía parasimpática en la inmunoregulación. La rama eferente del nervio vago, a través del núcleo motor dorsal, constituye una conexión entre el sistema nervioso y el sistema inmune y funciona como un mecanismo anti-inflamatorio en la inflamación local y sistémica. (Forsythe y Bienenstock, 2009).

Es importante destacar que estas vías parasimpáticas también pueden ser influenciadas por componentes de la vía humoral, ya que se ha demostrado que puede ser activado por la señalización mediada por las citocinas a través de Área Postrema (Borovikova et al., 2000).

2.6.3 SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO

El sistema nervioso simpático está asociado con las conductas de “pelea o huida”. Felten y Felten (1988) proporcionaron una base anatómica para la asociación entre la inmunidad y la actividad del SNS, mostrando que todos los órganos linfoides están inervados con fibras nerviosas simpáticas y que las terminales nerviosas se encuentran en las zonas donde residen las células inmunes; además, aproximaciones farmacológicas confirmaron que la norepinefrina liberada por el

sistema nervioso simpático se une a los receptores adrenérgicos expresados en las células inmunes (Berczi 2010). Las catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) pueden inhibir la producción de citocinas proinflamatorias tales como la IL-12 y TNF α o estimular la liberación de citocinas anti-inflamatorias tales como la IL-10 y TGF β , así como provocar la acumulación de neutrófilos locales para ayudar en la respuesta inflamatoria (Elenkov et al., 2000).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cerebro vigila de forma constante la homeostasis del cuerpo, incluyendo el estado inmunológico del organismo; esta información puede llegar al cerebro a través de las vías humoral, neural o ambas. Sin embargo, aún no se sabe si existe una diferencia en la transmisión de las señales inmunes al cerebro dependiendo de la magnitud del estímulo; si habría una comunicación diferencial ante un estímulo inmune, por ejemplo, el LPS, si este se administra en una dosis muy baja, o bien dosis más altas que involucren la producción de citocinas y la aparición de la conducta de enfermedad.

Como se mencionó en la introducción existen evidencias como el trabajo de Marpegan y colaboradores en el 2005, de que después de un reto inmune en el periodo de oscuridad se induce una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF) apoyando nuestra idea de que el NSQ está involucrado en la modulación de la respuesta inmune.

Por otra parte, se desconoce si la vía de entrada de la información inmune al cerebro depende del momento del día en el que ocurre la estimulación inmune.

Esto implicaría que el NSQ, el reloj circadiano maestro, regula y organiza la respuesta del sistema nervioso a un estímulo inmune de acuerdo a las necesidades del ciclo diario.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar la actividad de c-Fos en regiones representativas de las principales vías de entrada de la información inmune al cerebro (vía humoral y vía neural), así como del NSQ en respuesta a un estímulo de LPS en dos momentos del día y en dos concentraciones diferentes 0.002µg/kg y 1.6µg/kg, en ratas macho de la cepa Wistar.

Objetivos específicos

- 1) Cuantificar la cantidad de células inmunoreactivas para c-Fos en el AP y en el NTS de ratas después de una inyección intravenosa de LPS (dosis µg/kg) en dos momentos diferentes del día (ZT2 y ZT14).
- 2) Cuantificar la cantidad de células inmunoreactivas para c-Fos en el NSQ en respuesta a la administración de LPS en dos momentos diferentes del día (ZT2 y ZT14).
- 3) Analizar la actividad celular por medio de la cuantificación la actividad neuronal por medio del marcador c-Fos en el AP y en el NTS de ratas ante dos diferentes dosis (0.002µg/kg y 1.6µg/kg) de LPS
- 4) Analizar por medio de la cuantificación la actividad neuronal con el marcador c-Fos en el NSQ de ratas ante dos diferentes dosis de LPS.

5. HIPÓTESIS

Dependiendo de la dosis y el momento que se administre LPS, la información se procesará al cerebro de manera distinta.

Al administrar LPS en dos distintas dosis la información se transmitirá al cerebro por distinta vía; así también, la vía por la que esta información inmune llega hasta el cerebro va a ser distinta en el día que durante la noche.

Hipótesis específicas

a) Un estímulo inmune durante la fase de oscuridad (ZT14) inducirá una mayor activación en las regiones del NTS y el AP a diferencia de un reto inmune administrado durante la fase de luz (ZT2).

b) La administración de LPS en diferentes puntos temporales, ZT2 y ZT14 provocará distintas respuestas en el NSQ.

c) La dosis de 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS activará la vía neural, mostrando activación en el Núcleo Tracto Solitario, mientras que ante una mayor dosis de LPS se activarán tanto el AP (vía humoral) así como el NTS, por lo tanto, habrá comunicación del sistema inmune al cerebro a través de ambas vías.

d) La concentración de 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS no inducirá un aumento de las células inmunoreactivas para c-Fos en el NSQ. Sin embargo, la dosis mayor (1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS) inducirá un cambio en la actividad del NSQ

6. VARIABLES

Variables independientes

1. Administración intravenosa de LPS (0.002µg/kg y 1.6µg/kg)
2. Dos puntos temporales, es decir, un grupo durante el día y otro grupo durante la noche (momento del día de la administración, ZT2 y ZT14).

Variables dependientes

Cantidad de células inmunopositivas a c-Fos en el Área Postrema (AP), Núcleo del Tracto Solitario (NTS) y Núcleo Supraquiasmático (NSQ).

7. MATERIALES Y MÉTODO

7.1 ANIMALES Y CONDICIONES GENERALES

Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de 250-300 gramos al comienzo del experimento, se alojaron en jaulas individuales de acrílico (50x30x20 cm) y se mantuvieron en un cuarto de registro aisladas en condiciones de temperatura controlada ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) y con un flujo de aire continuo, bajo condiciones de luz-obscuridad (LD) 12:12, las luces se encendían a las 7:00 AM, definido como el tiempo Zeitgeber ZT0 y las luces apagadas 19:00 PM, definido como ZT12.

Los animales tuvieron libre acceso al alimento (alimento para roedores de laboratorio 5001, Purina, Minnetanka, MN, EE.UU.) y agua. Los procedimientos utilizados en este estudio se encontraban en estricta conformidad con las normas mexicanas para el manejo de animales Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que se ajusta a las directrices internacionales para el manejo de los animales,

y fueron aprobadas por el Comité de Ética en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales y su sufrimiento.

Los animales se dividieron en seis grupos experimentales. El primer grupo (n=4) recibió una dosis de LPS de 0.002 µg/kg en ZT2 a través de una cánula en la vena yugular; al segundo grupo (n= 6) se le administró la misma dosis de LPS en ZT14. Al tercer grupo (n=4) se le inyectó 1.6 µg/kg de LPS en ZT2. Al cuarto grupo (n=4) se le inyectó la misma dosis de LPS en ZT14. Los restantes 2 grupos (n=6 y n=6) fueron inyectados con solución salina en ZT2 y en ZT14.

Grupos experimentales:

| ZT2 | ZT14 |
|-------------|-------------|
| 0.002 µg/kg | 0.002 µg/kg |
| 1.6 µg/kg | 1.6 µg/kg |
| Control | Control |

7.2 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO PARA LA INSERCIÓN DE LA CÁNULA YUGULAR

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (1.8 mg/kg) y xylazina (1.0 mg/kg) de manera intra-muscular y fueron canulados en la vena yugular interna con un tubo de polietileno de silicio (0.025 in. i.d. and 0.047 in. o.d; Dow Corning Corp., Midland, MI, USA).

Los animales tuvieron un periodo de recuperación de 7 días, después de los cuales se les aplicó el estímulo inmunológico.

7.3 ESTÍMULO INMUNOLÓGICO

En la actualidad existen métodos anatómicos y bioquímicos relativamente sencillos que permiten el mapeo de las vías nerviosas y la identificación de los elementos neuronales que se activan en respuesta a estímulos sensoriales específicos; uno

de estos métodos es la detección de inmunohistoquímica de proteínas de expresión temprana (Janknecht et al; 1995).

C-Fos junto con c-Jun y c-Myc son un grupo de proteínas conocidas como factores de transcripción inducibles. Estas son utilizadas, por ejemplo, en las áreas de neuroanatomía y fisiología sensorial para visualizar neuronas individuales que han sido activadas por estímulos como la luz, sonido, olores. Estos marcadores de la actividad neuronal pueden ser visualizados mediante técnicas como: inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, las cuales sirven para evaluar la actividad o inhibición neuronal (Nemec et al., 2005).

Las ratas fueron inmunizadas con una inyección vía intravenosa (i.v.) de LPS (extraído de *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich Canadá, Ltd., Oakville, Ontario, Canadá) a concentración de 0.002µg/kg ó 1.6µg/kg (disuelto en solución salina estéril).

La solución para la inyección del LPS se preparó de un concentrado (1 mg LPS en 1ml salina) justo antes del experimento. Todas las inyecciones fueron en tiempo Zeitgeber ZT2 y ZT14, con ZT0 como el momento en que las luces se encienden y ZT12 cuando las luces se apagan.

Las ratas de los grupos control fueron inyectadas con una solución salina estéril (Cloruro de Sodio al 0.9 %) libre de endotoxinas, (1ml/kg) en los mismos tiempos que los grupos experimentales.

Los animales fueron sacrificados 90 minutos después de la administración del LPS, con el fin de obtener perfiles de actividad neuronal en el NSQ, NTS y AP.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo por medio de una sobredosis de pentobarbital sódico (Sedal-Vet 65 mg/mL) y se perfundieron de manera transcardial a través del ventrículo izquierdo del corazón con aproximadamente 150 mililitros de solución salina al 0.9% seguida de 150 ml de solución de paraformaldehído al 4 % diluido en un buffer de fosfato (PBS, 0.1 M, pH 7.2). Al finalizar la perfusión, los cerebros se extrajeron manualmente y se post-fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas, posteriormente, se almacenaron en sacarosa al 30% por aproximadamente 72 horas.

Los cerebros se congelaron y se cortaron en secciones coronales de 40 μm a lo largo de hipotálamo en un criostato a temperatura de -20°C .

7.4 EVALUACIÓN DE LA CANTIDAD DE ACTIVACIÓN NEURONAL.

La cuantificación de la proteína de expresión temprana c-Fos ha sido utilizada como marcador de activación neuronal en diversos estudios que utilizan al lipopolisacárido como estímulo.

Se sabe que la expresión de c-Fos es inducida (en la mayoría de los casos) por estímulos que provoquen la despolarización y una entrada importante de calcio a la célula, y que no requiere de nueva síntesis de proteínas para expresarse, lo cual favorece que la cantidad de proteína c-Fos aumente en la célula al poco tiempo después de ser estimulada (la expresión máxima ocurre aproximadamente a los 60 minutos).

La detección de c-Fos se hace mediante una técnica de inmunohistoquímica, la cual utiliza anticuerpos que se unen específicamente a un determinado antígeno. Se utilizan enzimas que tiñen un sustrato en visible (Montero 2003; Ramos 2005).

7. 5 INMUNOHISTOQUIMICA

Los cortes seleccionados de cerebro correspondientes al NSQ, AP y NTS, se incubaron con un anticuerpo primario c-Fos preparado en cabra, realizado a una dilución de 1:1000. Se incubaron por una hora a temperatura ambiente con agitación lenta y durante dos noches a 4°C .

Después se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS. Al terminar se incubó el tejido en Supermix (Buffer de dilución) con un anticuerpo secundario anti cabra a una dilución de 1:200 durante una hora a temperatura ambiente con agitación lenta. Se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron con Avidina y Biotina a una dilución de 1:500 en Supermix por una hora con veinte minutos a temperatura ambiente con agitación lenta.

Al finalizar la incubación, los cortes nuevamente se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS y al finalizar el último lavado, los cortes se revelaron con diaminobenzidina (DAB; 0.5 mg/ml, en amortiguador de trizma 7.2) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0.01%. Cada corte fue montado en láminas (porta-objetos) gelatinizadas y se deshidrataron en una serie de alcoholes con dilución creciente de 70%, 90%, 95% y etanol 100%, aclaradas con xilol para posteriormente ser cubiertas con cubre objetos y Permount (Fisher Chemicals).

7.6 CONTEO CELULAR

Con el fin de cuantificar la inmunoreactividad de c-Fos (Fos IR) se escogieron 3 secciones coronales representativas por núcleo de interés (AP, NTS y NSQ) de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998).

Para el NSQ -9.2 mm, (anterior), -1.30 mm (medial) y -1.40 mm (posterior), para el AP -13.68 mm (anterior), -13.80 mm (medial) y -14.08 mm (posterior) para el NTS -13.68 mm (anterior), -13.00 mm (medial) y -14.08 mm (posterior).

Las imágenes fueron examinadas bajo un microscopio de luz Nikon Eclipse E600 (Nikon, Tokio; Japón) y capturadas con un ocular de ampliación 20x. Las células inmunoreactivas positivas fueron contadas bilateralmente usando un sistema de análisis computarizado de la imagen (Image J, 1.42q, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD).

La densidad óptica del fondo fue establecida en una región próxima que no presentaba c-Fos. Los núcleos teñidos con un tamaño redondo de 20-150 píxeles que alcanzaron o superaron 2 veces la densidad óptica del fondo fueron considerados positivos y fueron contados mientras que los núcleos por debajo de este umbral de tinción fueron descartados. Las células positivas totales se determinaron bilateralmente en cada corte y los valores totales por individuo se promediaron por grupo.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si existe una variación en los dos puntos temporales de c-Fos, con las diferentes dosis se realizaron comparaciones de cada punto temporal con las diferentes dosis de LPS. El análisis estadístico se determinó por un análisis de anova de dos vías en donde se comparan las diferentes dosis de LPS contra los dos momentos del día, con una prueba Tukey *post Hoc*. El nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prisma 4 para Macintosh.

9. RESULTADOS

9.1 EVALUACIÓN DE LA VÍA DE ENTRADA DE INFORMACIÓN INMUNE ANTE UNA DOSIS DE 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DE LPS.

Evaluación de la activación neuronal en el Núcleo del Tracto Solitario (NTS) después de un estímulo de 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS en ZT2 y en ZT14.

Cuantificar la cantidad de células inmunoreactivas para c-Fos en el AP y en el NTS de ratas después de una inyección intravenosa de LPS (dosis $\mu\text{g}/\text{kg}$) en dos momentos diferentes del día (ZT2 y ZT14).

Para determinar la vía (humoral o neural) por donde entra la información de un reto inmunológico al cerebro, se determinó la cantidad de c-Fos (marcador de activación neuronal) en el NTS, considerado como parte de la vía neural. La administración de LPS (1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) tanto en ZT2 como en ZT14 aumentó el número de células positivas a c-Fos en el NTS en comparación con el grupo que recibió salina (Fig.4; $F(1, 16) = 163.2$; $P < 0.0001$). Sin embargo, la actividad neuronal inducida por la

administración de LPS en ZT2 no fue diferente de la inducida por la administración de LPS en ZT14.

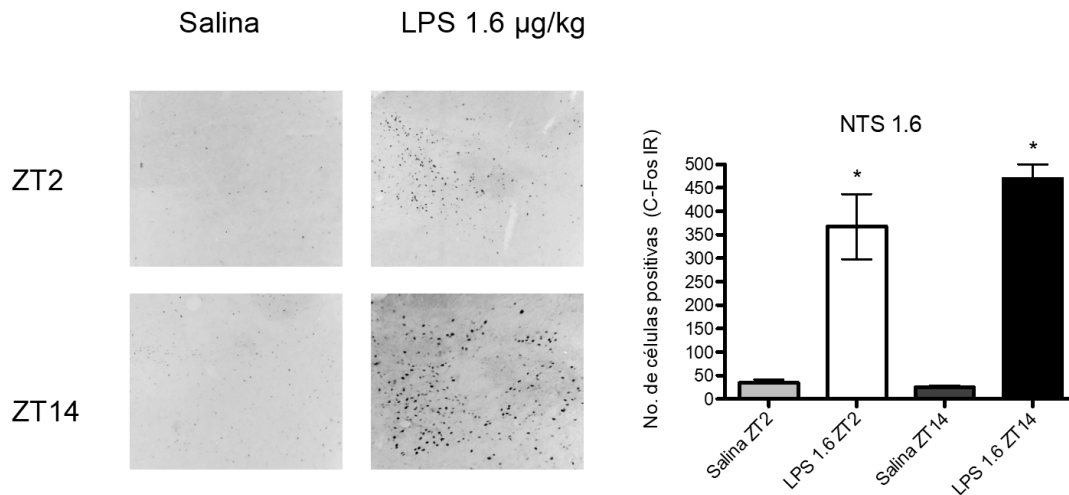


Figura 4. **Activación neuronal del NTS después de la administración de 1.6 µg/kg LPS.** La administración del LPS induce un aumento en la activación neuronal en ambos puntos temporales analizados (ZT2 n=4 y ZT14 n=4). Se muestra una sección representativa del NTS en dos puntos temporales con su respectivo grupo control. * $P < 0.001$ (Salina ZT2, Salina ZT14 en comparación con LPS ZT2 y LPS ZT14). El número de células positivas para c-Fos fue cuantificado bilateralmente en 3 cortes representativos. Los valores se expresan como el promedio \pm s.e.m (n=4 ratas por tratamiento).

Se realizaron comparaciones de las medias de los datos usando análisis de Varianza de dos vías. El análisis post hoc fue realizado por una prueba de Tukey. El nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$.

Evaluación de la activación neuronal en el Área postrema (AP) después de un estímulo de 1.6 µg/kg de LPS en ZT2 y en ZT14.

Para estudiar la vía de comunicación humoral entre el cerebro y el sistema inmune, evaluamos la activación neuronal del AP después de la administración de 1.6 µg/kg de LPS en ZT2 y ZT14. La administración de LPS en ZT14 (Fig. 5) indujo mayor expresión de c-Fos en el AP en comparación con su control ($P < 0.001$) y en comparación con la administración de LPS en ZT2 ($P < 0.001$). El reto con LPS en ZT2 también indujo un aumento en la actividad neuronal en comparación con su control ($P < 0.001$). La administración de LPS tanto en ZT2 como en ZT14 aumentó la actividad neuronal en el AP en comparación con su respectivo grupo control (Fig.5 $F(1, 16) = 185.4$; $P < 0.0001$).

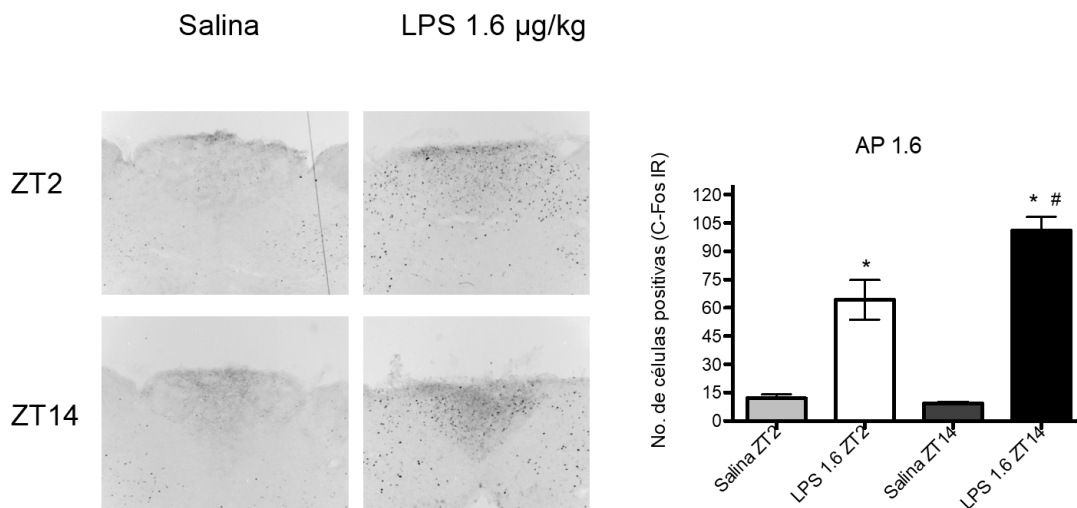


Figura 5. Activación del Área Postrema después de un reto inmune con 1.6 µg/kg de LPS. El AP presenta mayor activación después de un estímulo moderado de LPS durante la fase de oscuridad (ZT14) (* $P < 0.0001$, salina vs LPS, # $P < 0.01$ comparación LPS ZT2 vs ZT14). El número de células positivas para c-Fos fue cuantificado bilateralmente en 3 cortes representativos. Los valores se expresan como el promedio \pm s.e.m ($n=4$ ratas por tratamiento). Se realizaron comparaciones de las medias de los datos usando análisis de Varianza de dos vías El análisis post hoc fue realizado por una prueba de Tukey. El nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$

Se utilizó una anova de dos vías, con una prueba post hoc Tukey que revelo que si existen diferencias significativas entre la administración de LPS y salina en ZT2 así como en ZT14.

La actividad del Núcleo Supraquiasmático (NSQ) en respuesta a 1.6µg/kg de LPS, depende del horario de administración.

Diversos parámetros inmunes presentan variaciones circadianas en condiciones basales. Con la finalidad de estudiar el efecto del LPS en el reloj biológico, el NSQ, administramos 1.6 µg/kg de LPS en dos puntos temporales (ZT2 y ZT14) y evaluamos la actividad neuronal de dicho núcleo. Los animales inyectados con solución salina presentan una mayor cantidad de c-Fos durante el día (ZT2) que durante la noche (ZT14), lo cual corresponde al patrón normal de activación circadiana del NSQ. Sin embargo, no se observan diferencias en la actividad normal del NSQ, siendo ésta mayor durante el día y menor durante la noche $F_{(1,16)}=59.41; P < 0.0001$).

La administración de 1.6 µg/kg de LPS en ZT2, disminuye la actividad neuronal en comparación con su control; por el contrario, la administración de LPS en ZT14, induce un aumento en c-Fos en comparación con su control (Fig. 6).

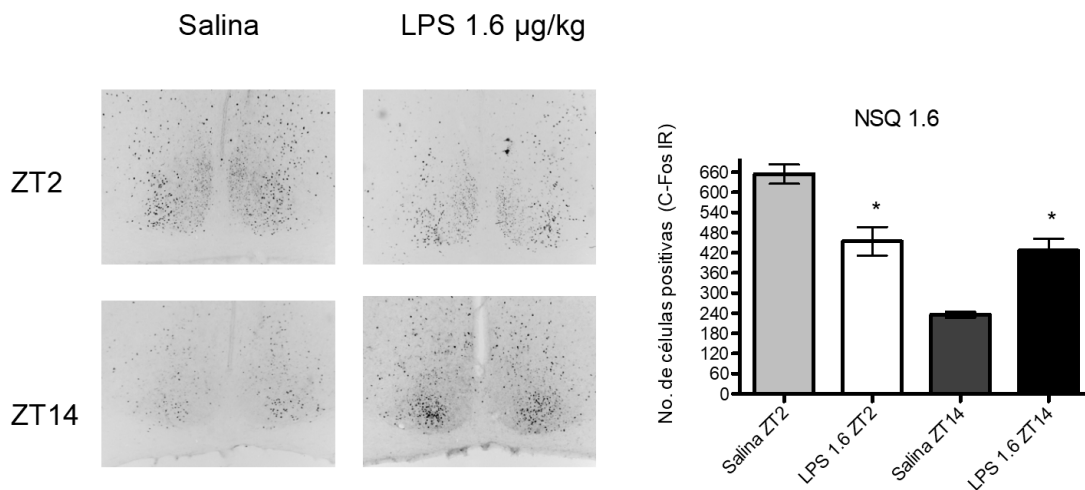


Figura 6. **Activación neuronal en el NSQ después de la administración de 1.6 µg/kg de LPS en ZT2 y ZT14.** La administración de LPS en ZT2 disminuye la activación neuronal del NSQ en comparación con su control (*P< 0.0001 Salina vs LPS) mientras que la inyección del LPS en ZT14 aumenta la actividad neuronal del NSQ en comparación con su grupo control (*P< 0.001). El número de células positivas para c-Fos fue cuantificado bilateralmente en 3 cortes representativos. Los valores se expresan como el promedio ± s.e.m (n=4 ratas por tratamiento). Se realizaron comparaciones de las medias de los datos usando análisis de Varianza de dos vías. El análisis post Hoc fue realizado por una prueba de Tukey. El nivel de significancia se estableció en P<0.05.

Los resultados previamente mostrados sugieren que la entrada de la información inmune de 1.6µg/kg de LPS es a través de las vías humoral y neural; por lo tanto, decidimos investigar la vía mediante la cual una dosis de 0.002 µg/kg de LPS, que se encuentra de manera fisiológica en las ratas a la mitad de la fase de oscuridad (Cani, et al., 2007) es comunicada al cerebro.

9.2 EVALUACIÓN DE LA VÍA DE ENTRADA DE INFORMACIÓN INMUNE ANTE UNA DOSIS DE 0.002 µg/kg DE LPS

La administración de 0.002 µg/kg de LPS en ZT14 induce una mayor activación neuronal del NTS.

La administración de 0.002 µg/kg de LPS en ZT2, induce una mayor cantidad de células inmunoreactivas para c-Fos en el NTS en comparación con su control (Fig. 7, ($F_{(1,18)}=53.90$; *P < 0.0001). Como mencionamos anteriormente, el NTS es considerado como parte de la vía neural; la activación de este núcleo en respuesta al LPS, demuestra que es capaz de censar dosis muy bajas de este antígeno. Por otro lado, la inyección del LPS en ZT14 induce una mayor expresión de c-Fos en comparación con su control y en comparación con la administración de LPS en ZT2 (*P < 0.001).

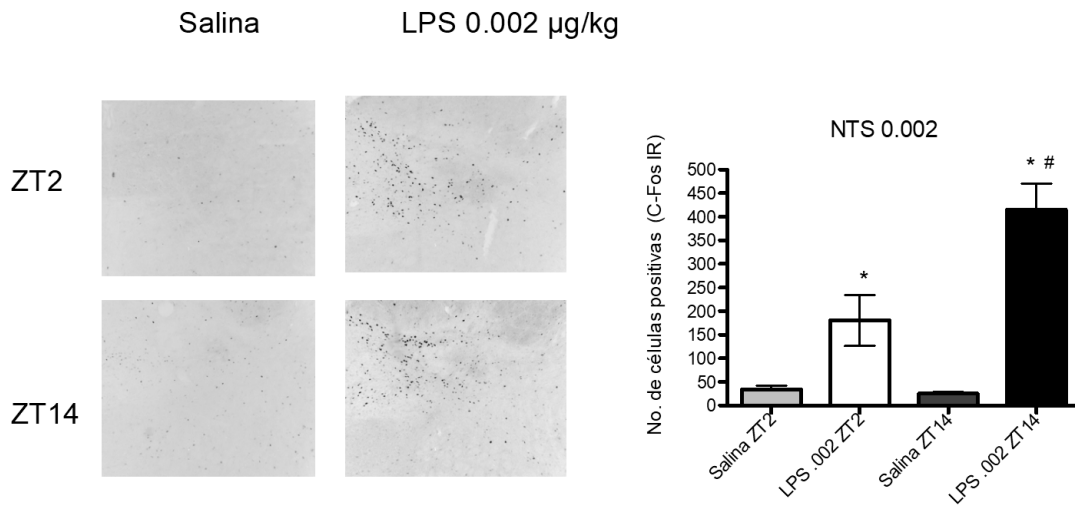


Figura 7. **Activación neuronal del NTS ante un reto de LPS.** La administración de una dosis “fisiológica” de LPS induce una mayor activación neuronal (c-Fos) en el NTS en ZT14 (n=6) en comparación con ZT2 (n=4). El número de células positivas para c-Fos fue cuantificado bilateralmente en 3 cortes representativos. Los valores se expresan como el promedio \pm s.e.m. Se realizaron comparaciones de las medias de los datos usando análisis de Varianza de dos vías. El análisis post Hoc fue realizado por una prueba de Tukey. El nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$.

Evaluación de la activación neuronal del AP después de un estímulo de 0.002 µg/kg LPS en ZT2 y en ZT14.

Con la finalidad de investigar si un reto inmune a una baja concentración (0.002 µg/kg de LPS) tiene la capacidad de comunicarse con el cerebro a través de la vía humoral, evaluamos la expresión de c-Fos en el AP después de la administración de LPS en los dos puntos temporales antes estudiados.

La administración de LPS en ZT14 induce la activación neuronal del AP en comparación con su control, evaluado mediante un ANOVA de dos vías y una prueba post Hoc de Tukey ($F_{(1,18)}=7.815$; $P < 0.05$), sin embargo, la administración de LPS en ZT2 no indujo un aumento en la expresión de c-Fos en comparación con

su control (salina) en el mismo punto temporal. Lo anterior sugiere que sólo durante el periodo de oscuridad, el AP tiene la capacidad de activarse ante bajas concentraciones de LPS (Fig. 8).

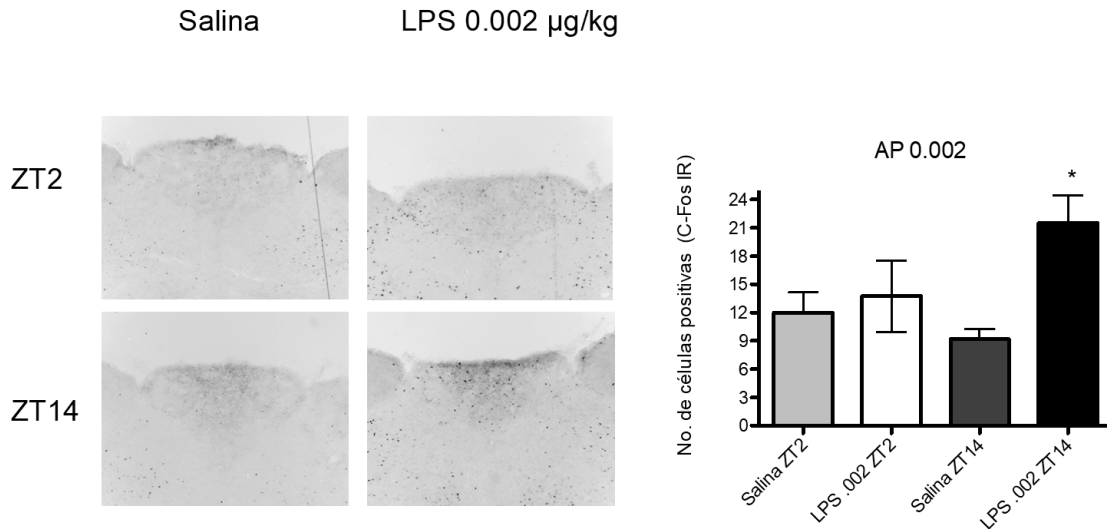


Figura 8. **Activación del AP después de la administración de 0.002 µg/kg de LPS**

Se observa una mayor activación del AP después de la administración del reto inmune en la fase de actividad (ZT14 *P < 0.001 Salina vs LPS) en comparación con la fase de descanso (ZT2) en la cual no se muestra ninguna diferencia significativa con el grupo control (salina). El número de células positivas para c-Fos fue cuantificado bilateralmente en 3 cortes representativos. Los valores se expresan como el promedio \pm s.e.m (n=4 ratas por tratamiento). El análisis post Hoc fue realizado por una prueba deTukey.

Evaluación de la activación neuronal del Núcleo Supraquiasmático después de un reto de 0.002 µg/kg de LPS en ZT2 y en ZT14

Los efectos de 0.002 µg/kg de LPS en el NSQ se evaluaron en ZT2 y en ZT14. La administración de LPS en ZT2 disminuyó de manera significativa la actividad neuronal del NSQ en comparación con su control (Fig. 9 F $(1,18)= 29.72$ P<0.0001)), mientras que el LPS en ZT14 aumentó la actividad neuronal de dicho núcleo (P<0.05)

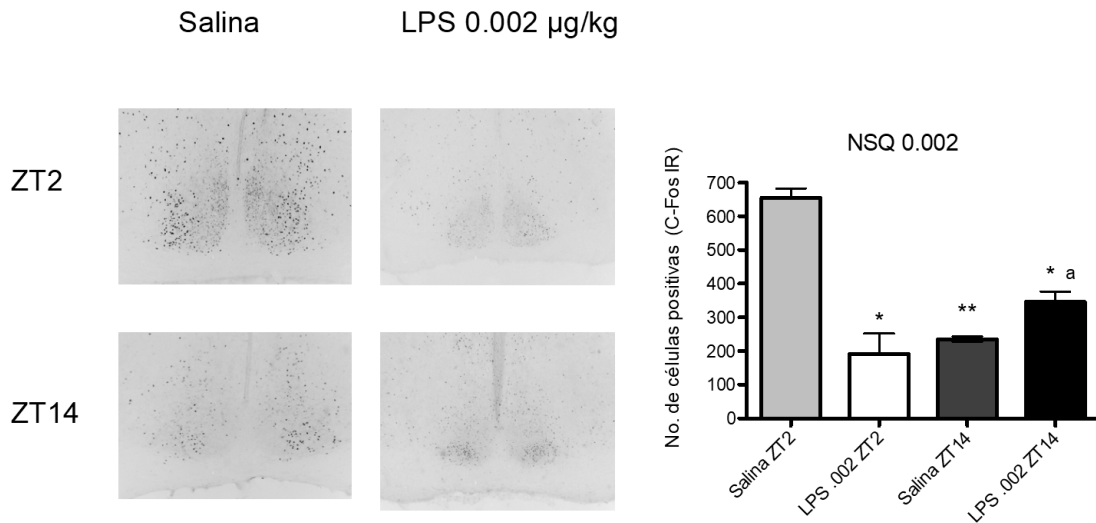


Figura 9. **Activación neuronal del NSQ después de la administración de 0.002 µg/kg de LPS.** La administración de 0.002 µg/kg de LPS en ZT2 (n=4) (* P < 0.0001) induce disminución en la actividad neuronal del NSQ en ZT2 en comparación con su grupo control (salina), mientras que en ZT14 el LPS induce la actividad neuronal de dicho núcleo (*P =<0.05). El número de células positivas para c-Fos fue cuantificado bilateralmente en 3 cortes representativos. Los valores se expresan como el promedio ± s.e.m.

9.3 ANÁLISIS DE LA ENTRADA DE INFORMACIÓN INMUNOLOGICA POR LA VÍA HUMORAL Y NEURAL

Comparación de la activación neuronal del NTS después de 0.002 µg/kg o 1.6 µg/kg de LPS en ZT2 y en ZT14.

Un análisis de anova de dos vías indica que existe un efecto significativo dependiendo del tiempo de administración ($F_{[1,24]}=10.43$; $p<0.01$), así como en las diferentes dosis de LPS ($F_{[2,24]}=49.10$; $p<0.001$). Existe un efecto significativo de interacción entre las dosis y los tiempos ($F_{[2,24]}=4.838$; $p<0.05$).

La administración de 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS en ZT2 (durante el periodo de actividad neuronal del NSQ) aumentó de manera significativa (Fig. 9 A, $P < 0.05$) la expresión de c-Fos en el NTS en comparación con la dosis de 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ administrada en el mismo punto temporal (Fig. 10 A). Sin embargo, cuando el LPS fue administrado durante la fase de obscuridad (ZT14), no se observaron diferencias significativas entre la actividad neuronal inducida por las dosis de LPS utilizadas (Fig. 10 B). Lo anterior sugiere que, en este punto temporal (ZT14), la señal de una dosis “fisiológica” (0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de LPS se traduce de la misma manera que una dosis más alta (1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

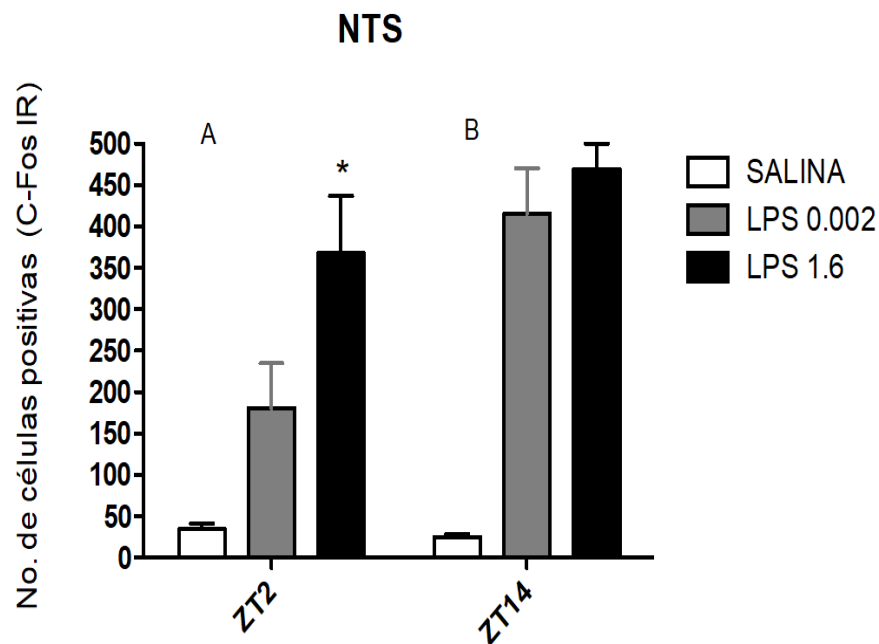


Figura 10. **Activación del NTS después de la administración de 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS y 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS en ZT2 Y ZT14.** (A) La administración de 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LPS induce una mayor actividad neuronal del NTS en ZT2 en comparación con la dosis de 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS (B) mientras que en ZT14 se observa que después de la administración de las distintas dosis de LPS, se induce una similar activación neuronal del NTS. El número de células positivas para c-Fos fue cuantificado bilateralmente en 3 cortes representativos. Los valores se expresan como el promedio \pm s.e.m.

La expresión de c-Fos en el AP depende de la dosis de LPS administrada.

Sabemos que el AP es un órgano circunventricular asociado con la entrada de la información inmune hacia el cerebro a través de la vía humoral. En la figura 11 A observamos que un reto inmune de 1.6 µg/kg de LPS aumenta la expresión de c-Fos tanto en ZT2 como en ZT14 estos resultados en comparación con los obtenidos después de administrar 0.002 µg/kg de LPS (Fig. 11 B. ($F_{[2,24]}=130.2$; $P<0.0001$); lo que nos sugiere que la información de 1.6 µg/kg de LPS está siendo censada por el AP en ambos puntos temporales. Presentando mayor sensibilidad durante el periodo de oscuridad, ya que la activación neuronal en ZT14 fue mayor.

Si bien la dosis “fisiológica” de LPS induce la activación del AP, la expresión de c-Fos es mayor cuando se administra una dosis más elevada, lo cual sugiere que existe una relación directamente proporcional entre la dosis de LPS y la expresión de c-Fos en el AP.

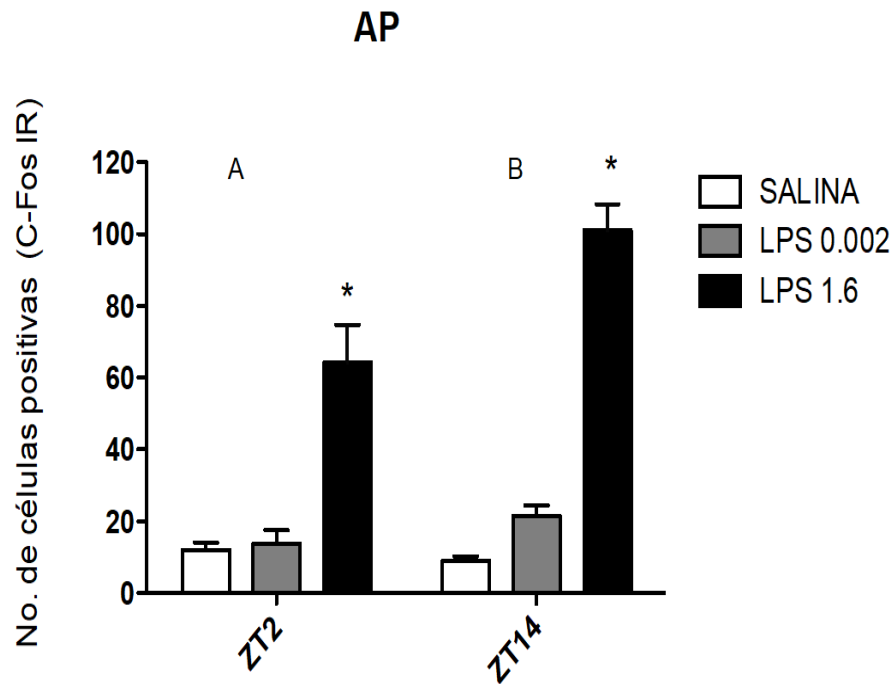


Figura 11. **Expresión de c-Fos en el AP después de la administración de LPS en ZT2 y en ZT14.** (A) La administración de 1.6 µg/kg de LPS induce la activación neural del AP tanto en ZT2 como en ZT14, mientras que la administración de 0.002 µg/kg de LPS (B) sólo induce una ligera activación neuronal cuando es administrada en ZT14. El número de células positivas para c-Fos fue

cuantificado bilateralmente en 3 cortes representativos. Los valores se expresan como el promedio \pm s.e.m.

Evaluación de la actividad neuronal del NSQ después de un reto de 0.002 y 1.6 μ g/kg de LPS en ZT2 y ZT14

La administración de 1.6 μ g/kg de LPS en ZT2 (Fig. 12 A) disminuye la activación neuronal del NSQ en comparación con su control (salina); de la misma manera la administración de 0.002 μ g/kg de LPS en ZT2 (Fig. 12 B) disminuye la activación neuronal del NSQ en comparación con su control y en comparación con la dosis de 1.6 μ g/kg de LPS en ZT2 La administración de 0.002 μ g/kg de LPS en ZT14, induce la activación del NSQ, mientras que la administración de 1.6 durante el mismo punto temporal tiene el mismo efecto en el NSQ ($F_{(2,24)}=17.26$; $P < 0.0001$).

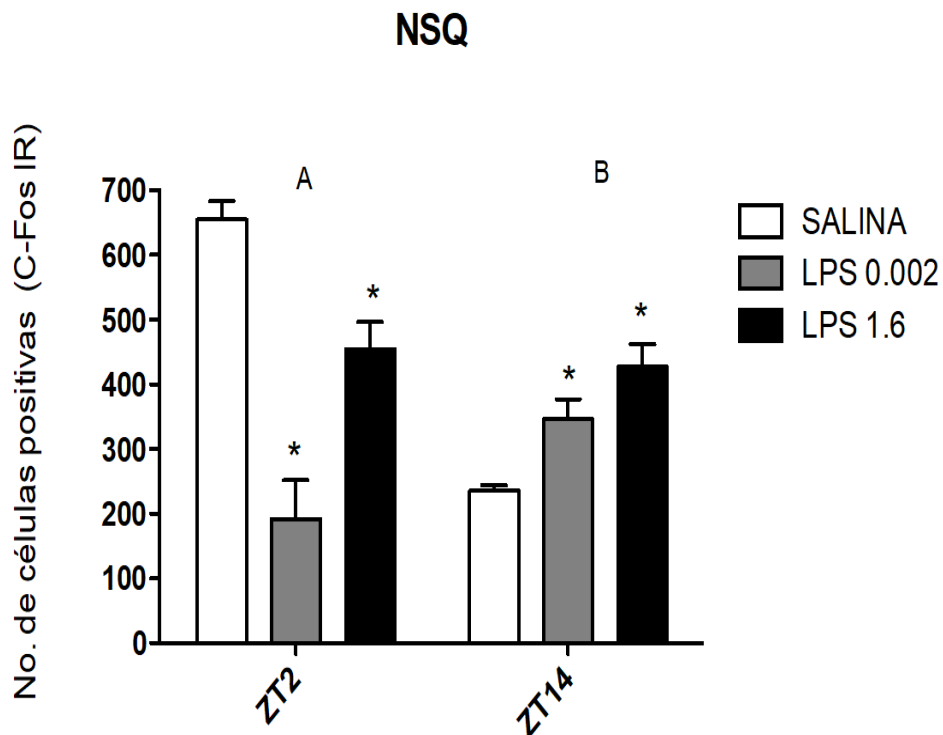


Figura 12. Activación del NSQ después la administración de diferentes dosis de LPS.

La administración de LPS en ZT2 (tanto 1.6 µg/kg como 0.002 µg/kg) disminuye la actividad neuronal del NSQ en comparación con su control. Esta disminución es mayor cuando se administran 0.002 µg/kg de LPS. La administración de LPS en ZT14 (tanto 1.6 µg/kg como 0.002 µg/kg) aumenta la actividad neuronal en el NSQ. El número de células positivas para c-Fos fue cuantificado bilateralmente en 3 cortes representativos. Los valores se expresan como el promedio \pm s.e.m.

10. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó la interacción entre el cerebro y la respuesta inmune, a través del análisis de la actividad neuronal de diversos núcleos después de la administración de un estímulo inmune con dos dosis de LPS en dos puntos temporales (ZT2 y ZT14). Las dosis de LPS utilizadas pueden ser consideradas “bajas”, pues se ha reportado que durante el final del periodo de oscuridad, las ratas presentan 10 unidades endotóxicas de LPS en plasma (Cani et al., 2007), que equivalen a una dosis de 0.002 µg/kg de LPS.

La vía de entrada de la información al cerebro depende de la dosis de LPS así como de la hora de administración

La vía neural se activa por la estimulación de las fibras sensitivas aferentes del nervio vago indicando al cerebro que la inflamación está ocurriendo. Estas fibras pueden ser activadas por citocinas o directamente por el LPS debido a la presencia de sus receptores (TLR4) en el nervio vago aferente, específicamente en el ganglio nodoso (Hosoi et al., 2005). A través de este mecanismo se detecta la activación inducida por las citocinas que producen las células dendríticas y macrófagos, así como por otras células inmunológicas asociadas al nervio vago (Schwarz y Bilbo, 2012).

Al evaluar esta vía de entrada de la información inmune al cerebro, cuantificamos que una dosis de 0.002 µg/kg de LPS (la dosis más baja utilizada en este estudio) fue suficiente para inducir la activación neuronal en el Núcleo del tracto solitario

(NTS) considerado como parte de la vía neural de comunicación y a donde llegan las innervaciones sensoriales del nervio vago. Las fibras aferentes del vago visceral, situadas en el ganglio nodoso, terminan principalmente dentro del complejo dorsal vagal. El complejo vagal dorsal DVC está constituido por el núcleo del tracto solitario (NTS), el Núcleo Motor Dorsal del Vago (DMV) y el área postrema (AP) (Schwarz y Bilbo 2012).

Nuestros resultados demuestran que el NTS es capaz de detectar dosis muy bajas de LPS y activarse independientemente de la hora a la cual haya sido administrado el reto inmune. Sabemos que el nervio vago inerva al hígado, el bazo, el estómago, el intestino y el esófago; por otra parte, se ha reportado que la rama hepática del nervio vago es una de las principales rutas de transducción sistémica inflamatoria que señala al cerebro (Romanovsky, 2000). Debido a que la vía de administración del LPS en este trabajo fue intravenosa y el hígado es el principal órgano de procesamiento del LPS y de otros antígenos provenientes de la comida (Freudenberg y Galanos, 1990), además de contener el mayor depósito de macrófagos en el cuerpo (células de Kupffer), éste órgano podría ser el principal encargado de la transmisión de la señal inmune al cerebro a través de la vía neural. Son necesarios más estudios para comprobar lo anterior.

Aunque la expresión de c-Fos en el NTS después de administrar 0.002 µg/kg de LPS en ZT2 fue menor en comparación con la activación inducida por 1.6 µg/kg de LPS en el mismo punto temporal, la administración de 0.002 µg/kg de LPS en ZT14 indujo una expresión de c-Fos en el NTS comparable a la inducida por la dosis de 1.6 µg/kg de LPS en ambos puntos temporales. Lo anterior sugiere diferencias circadianas en la transmisión de la señal inmune fisiológica a través de la vía neural. La expresión diferencial a lo largo del ciclo luz oscuridad de los receptores específicos para el LPS (TLR4) en el ganglio nodoso, podría explicar las diferencias circadianas en la activación del NTS después de la administración del LPS. Sin embargo, lo anterior no ha sido demostrado.

Por su parte, la dosis de 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS indujo niveles similares de c-Fos en el NTS tanto en ZT2 como en ZT14, lo cual indica que en ambos puntos temporales la señal inmune se transmite al cerebro con la misma intensidad.

Nuestros resultados concuerdan con diversos estudios en los cuales también se utiliza la expresión de c-Fos como un marcador de actividad neuronal y se demuestra que el NTS presenta inmunoreactividad para c-Fos en respuesta a la administración de LPS (Konsman 1999; Sagar 1995). A diferencia de los estudios previamente mencionados, nosotros utilizamos dosis bajas de LPS que no habían sido estudiadas. La dosis más baja de LPS de la cual se tiene reporte, fue utilizada por Elmquist y colaboradores 1996, en dicho estudio se administraron 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS i.v en un solo punto temporal y se reporta baja activación neuronal en el NTS en comparación con una dosis más alta de LPS (125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS i.v).

El presente estudio también sugiere que la activación del NTS puede ser directamente proporcional a la dosis de LPS administrada. Sin embargo, esta relación parece depender de la hora a la cual se administra el LPS ya que la administración de 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS en ZT14 induce activación neuronal similar a la inducida por la dosis más alta (1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Al evaluar la activación neuronal en respuesta a la administración de 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS del Área postrema (AP), uno de los núcleos considerados como parte de la vía humoral, observamos que esta dosis de LPS en ZT2 no aumenta la expresión de c-Fos en comparación con su control. Sin embargo, la inyección de 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS en el mismo punto temporal (ZT2) indujo una mayor expresión de c-Fos en comparación con la administración de solución salina y en comparación con la activación neuronal inducida por la dosis más baja. Lo anterior sugiere que la principal vía de transmisión de la señal inmune después de la administración de 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS en ZT2 es a través de la ruta neural, ya que la expresión de c-Fos sólo se observa en el NTS y no así en el AP.

Al estudiar la activación neuronal del AP después de la administración de 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LPS en el periodo de actividad (ZT14) en los roedores, observamos que esta dosis de LPS induce un aumento en la expresión de c-Fos en comparación con la

administración de salina y en comparación con la administración de LPS en ZT2. Esta diferencia circadiana en la inducción de la expresión de c-Fos en el AP no sólo se observa después de administrar 0.002 µg/kg de LPS; la administración de 1.6 µg/kg de LPS en ZT14 también aumentó la activación neuronal de dicho núcleo en comparación con su control y en comparación con el LPS administrado en ZT2.

Una de las explicaciones posibles para esta diferencia circadiana en la activación podría ser la siguiente: En la vía humoral, las citocinas pueden ejercer sus efectos en el cerebro directamente a través de su unión a receptores específicos presentes en los órganos circunventriculares (CVO'S) como son: OVLT, SFO, EM, y el AP (Johnson et al., 2003), la unión de las citocinas a sus receptores específicos en estos sitios dentro del cerebro, permite la transmisión de la señal hacia lugares específicos del hipotálamo e inician una cascada neuronal (Gaykema et al., 2000). Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la administración de LPS en el periodo de oscuridad (ZT14) induce una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF-α) en comparación con las producidas cuando el LPS se administra en el periodo de luz (ZT2) (Guerrero et al., 2014). Lo anterior podría explicar las diferencias en el aumento de la activación del AP después de administrar el LPS en ZT14, ya que al inducir una mayor producción de citocinas éstas podrían estar uniéndose a sus receptores en el AP (Marvel et al., 2004) induciendo una mayor activación neuronal. Por otra parte, no podemos descartar la posibilidad de que el LPS administrado en ZT14 se “sume” al LPS que se presenta de manera fisiológica durante ese periodo del día (Cani et al., 2007) y de esta manera pueda activar a sus receptores específicos (TLR4/CD14) en el AP (Rivest 2003). Si la unión del LPS a sus receptores es mayor, las células inmunes presentes en dicho núcleo podrían estar induciendo la producción de diversas citocinas así como de otras moléculas mediadoras de la respuesta inmune que son indispensables para la inducción de la activación neuronal.

La mayor producción de citocinas en respuesta a la administración de LPS en ZT14 no sólo podría explicar el aumento de la expresión de c-Fos en el AP, sino también lo observado en el NTS como resultado de la inoculación de LPS en este mismo punto temporal. Se sabe que el NTS recibe proyecciones neuronales desde el AP

(Rivest, 2003). Ya que el AP se encuentra activada después de la administración de LPS, lo cual suponemos que es debido a la alta concentración de citocinas plasmáticas o a la unión del mismo LPS a sus receptores en este núcleo, pensamos que el AP a través de sus proyecciones hacia el NTS también podría estar contribuyendo en la activación de este último.

La evaluación de la actividad neuronal inducida por la administración de 1.6 µg/kg, de LPS en ZT2 y en ZT14 demuestra que esta dosis de LPS es capaz de inducir la activación neuronal tanto en el NTS como en el AP. Por lo cual, podemos sugerir que la información inmunológica generada con esta dosis de LPS puede llegar por la vía humoral y por la vía neural. Lo anterior también se sugiere para la dosis de 0.002 µg/kg de LPS pero sólo durante el periodo de oscuridad (ZT14) ya que en ZT2 esta dosis sólo fue capaz de inducir la activación neuronal de la vía neural (NTS).

El NSQ es capaz de responder a la administración periférica de dosis bajas de LPS

Diversas funciones inmunes presentan ritmos circadianos, incluyendo la expresión de diversas citocinas, el número de linfocitos, así como la actividad de células fagocíticas (Arjona y Sarkar 2005; Hayashi et al., 2007; Keller et al., 2009).

Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que lesiones bilaterales del NSQ aumentan la producción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a la administración de 1.6 µg/kg de LPS, sugiriendo que el NSQ regula la producción de estas citocinas (Guerrero Vargas et al., 2014).

Al evaluar la expresión de c-Fos en el NSQ después de administrar 0.002 y 1.6 µg/kg de LPS en ZT2, observamos que ambas dosis de LPS inducen una disminución en la actividad neuronal del NSQ en comparación con el grupo control (salina). Cabe señalar que los niveles de expresión de c-Fos en el NSQ varían de

manera fisiológica a lo largo del ciclo luz-oscuridad, siendo mayores durante la fase de luz y menores en la fase de oscuridad (Aronini et al., 1990).

La disminución de c-Fos en respuesta al reto inmune con LPS en ZT2, fue más evidente en la zona dorso-medial del NSQ, mientras que la actividad neuronal de la región ventral pareció no modificarse. Lo anterior es relevante debido a que se sabe que la información lumínica se transmite desde la retina hacia la región ventral del NSQ, a través del tracto retino-hipotalámico y que depende de neuro-transmisión glutamatérgica. Por otra parte, se ha demostrado que las neuronas de la región ventral del NSQ proyectan a la región dorso-medial, cuyas células expresan típicamente vasopresina (VP) y a diferencia de la región ventral, reciben escasa inervación desde la retina (Moore et al., 2002).

Nuestro análisis sugiere que la actividad neuronal de la región retino-recipiente (ventral) no disminuye en respuesta al LPS en ZT2, pero no muestra qué tipo de neuronas están activas. Estudios demuestran que la región ventral tiene fuertes efectos en el cambio de fase de la región dorsal del NSQ y señalan a GABA como un importante sincronizador entre ambas regiones del NSQ (Henk et al., 2005). También ha sido demostrada la comunicación neuronal de la actividad de impulsos eléctricos y mediadores químicos entre ambas regiones del NSQ. Por lo tanto, no podemos descartar cambios en el perfil de activación neuronal en respuesta al LPS que pudieran ser responsables de la disminución de la actividad neuronal observada en la región dorsal.

A diferencia del LPS administrado en ZT2, la misma dosis administrada en ZT14 indujo un aumento en la actividad neuronal del NSQ en comparación con el grupo control (salina). La activación neuronal fue evidente en la región ventrolateral del núcleo, un área relevante en la recepción de luz y la foto-transducción (Mikkelsen, 1995).

Esto sugiere que el LPS podría estar mimetizando la recepción de luz en el NSQ. Otros estudios han demostrado que la administración intracerebroventricular lateral de una mezcla de citocinas (TNF- α e IFN γ) también induce un aumento en la expresión de c-Fos en la región ventrolateral del NSQ cuando la mezcla de citocinas

es administrada en la primeras horas de la noche (Sadki et al., 2007). Esta observación podría explicar por qué en estudios previos se ha concluido que el LPS induce cambios de fase en el NSQ así como cambios en la expresión de genes del reloj en el NSQ (Takahashi 2001; Marpegan 2009, 2005; Okada 2008).

11. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la vía de transmisión de las señales inmunes desde la periferia hacia el cerebro depende de la magnitud de las dosis administradas, así como del momento del día en el cual éste es administrado. La dosis más alta de LPS utilizada (1.6 µg/kg) indujo la activación neuronal de núcleos involucrados en la vía de comunicación neural, así como en la humoral. La dosis más baja indujo la activación de núcleos implicados en la vía neural y sólo activó ambas vías de comunicación cuando el reto fue administrado durante el periodo de oscuridad. Lo anterior sugiere la participación del reloj circadiano en la regulación de la producción de mediadores inmunes capaces de señalizar hacia el cerebro.

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Rudolf Marinus Buijs, mi revisora la Dra. Carolina Escobar Briones y los miembros de mi sínodo: Dra. Irma Yolanda del Río Portilla, Dra. Pilar Durán Hernández y al Dr. Cesar Casasola Castro. La experiencia y paciencia de cada uno de ellos contribuyeron a mi experiencia en el camino de la investigación.

Gracias a mi amada familia por su amor incondicional y su gran apoyo en todo momento: Papá, Mamá, Viri, Alma.

Gracias Adolfo por apoyarme en todo este camino, amigos y compañeros de laboratorio donde realicé esta investigación: Natali Guerrero Vargas, Mara Guzman, Roberto Salgado, Maricarmen Basualdo, Nadia Saderi.

Me gustaría agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Psicología, Instituto de investigaciones biomédicas por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de avanzar en mi carrera profesional.

Quiero expresar mi gratitud a la Dra. Olga Rojas por la paciencia y apoyo en todo este proceso.

REFERENCIAS:

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S (2007). Cellular and molecular immunology. 6th edition. China
- Abrahamson EE, Leak RK, Moore RY (2001). The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport*; 12: 435-440.
- Arjona A, Boyadjieva N, Sarkar DK (2004). Circadian rhythms of granzyme B, perforin, IFN-gamma and NK cell cytolytic activity in the spleen: effects of chronic ethanol. *J Immunol*; 172: 500-508.
- Arjona A, Sakar DK (2005). Circadian oscillations of clock genes, cytolytic factors, and cytokines in rat NK cells; *J Immunol* 174: 7618-24.
- Aronini N, Sagar SM, Sharp FR, Schwartz WJ (1990). Light regulates expression of a Fos-related protein in rat suprachiasmatic nuclei. *Proc Nat. Acad. Sci*, 87: 5959-5962.
- Anderson K (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Elsevier Science*; 12: 13-19
- Ban EM, Sarlieve LL, Haour FG (1993). Interleukin-1 binding sites on astrocytes. *Neuroscience*; 52: 725-733.
- Bermejo A, y Duarte J. (2003). Mecanismos de traducción del lipopolisacárido. 44(2), 121-139
- Berczi I (1998). Neurohormonal host defense in endotoxin in shock. *Ann N Y Acad Sci*; 840: 787-802.
- Berczi I (2010). New insights to neuroimmune biology, *Elsevier insights*. Pages 163-176, 237-263.
- Blalock JE (2002). Harnessing a neural-immune circuit to control inflammation and shock. *J Exp Med*; 6: 25-28.
- Blatteis CM (1992). Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. *Progress in Brain Research*; 91: 409-412.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumard N, Eaton JW, Tracey KJ (2000). Vagus nerve stimulation

- attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*; 405: 458-462.
- Brailowsky S (2002). Las sustancias de los sueños. *Neuropsocofarmacología*. 3ra edición. México. Colección, la ciencia para todos; 130
- Buijs RM, Kalsbeek (2001), Hypothalamic integration of central and Peripherals clicks. *Nature reviews*. vol 2: 521-526.
- Buijs, RM, Scheer FA, Kreier F, Yi C, Bos N, Goncharuk VD, Kalsbeek A (2006). Organization of circadian functions: interaction with the body. *Prog Brain Res*, 153:341-360.
- Caballero L, Herrera E (1999). Fisiopatología de la fiebre. *Rev Cubana Med Milit* 28 1:49-54.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Audrey M (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*; 56(7): 1761-1772.
- Card JP, Moore RY (1989). Organization of latelageniculate hypothalamic connections in the rat. *J Comp Neurol*; 284: 135-147.
- Cardinali DP, Bernasconi PA (2009). Ritmos biológicos en neuroendocrinología revista SAEGRE. 3: 5-25
- Casiraghi LP, O Croci D, Poirier F, Rabinovich GA, Golombek DA (2010). "Time sweet time": circadian characterization of galectin-1 null mice. *Biomed Central. Journal of Circadian Rhythms*; 8: 4 (1-7)
- Castellanos M, Rodríguez K, Delgado R, Escobar C (2002). Anatomía de un reloj (anatomía del sistema circadiano) *Arch Mex Anat Nueva Epoca*; vol (2):17-20.
- Coogan A, Wyse C (2008). Neuroimmunology of the circadian clock. *Brain research*; 1232:104-112.
- Dallaporta M, Pecchi E, Jacques C, Berenbaum F, Jean A, Thirion S, Troace JD (2007). C-Fos immunoreactivity induced by intraperitoneal LPS administration is reduced in the brain of mice lacking the microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1). *Brain, Behavior and Immunity* 21: 1109-1121.

- Dantzer R, Konsman JP, Bluthé RM, Kelley KW (2008). Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent?. *Autonimis Neuroscience: Basis and clinical*; 85:60-65.
- Dantzer R (2001). Cytokine induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Sci*: 933: 222-234.
- Dibner C, Schibler U, Albrecht U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual reviews of physiology*, 72: 517-49.
- Du YZ, Fan S, Meng Q, Wang G, Tong J (2005), Circadian expression of clock and screening of clock-controlled genes in peripheral lymphocytes of rat. *Biochem, Biophys. Res. Commun*, 336: 1069-1073.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrous GP, Vizi E (2000). The sympathetic nerve- An integrative interface between two supersystems: The brain and the immune system. *Pharmacological Reviews*; 52: 595-638.
- Elmquist JK, Scammell TE, Jacobson CD, Saper CB (1996). Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. *J Comp. Neurol*; 371: 85-103.
- Escobar A, Gómez B (2008). Barrera hematoencefálica. *Neurobiología, implicaciones clinicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. Revista Mexicana de Neurociencia*; 9(5): 395-405.
- Felten DL, Felten SY (1988). Sympathetic noradrenergic innervation of immune organs. *Brain Behav Immun*; 2: 293-300.
- Freudenberg MA, Galanos (1990). Bacterial lipopolysaccharide; structure, metabolism and mechanisms of action. *International reviews if immunology*; 6:207-221.
- Forsythe P, Bienenstock J (2009). Neural regulation of the immune response. En: *Allergy fronties: classification and pathomechanims, Volume 2 of the series Allergy Frontiers*. Springer Japan.
- Gachon F, Nagoshi E, Brown SA, Ripperger J, Schibler U (2004). The mammalian circadian timing: from gene expression to physiology. *Chromosoma*; 113: 103-112.

- Ganong W. (2000). Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 27, 422-427.
- Gaykema RP, Goehler LE, Hansen MK, Maier SF, Watkins LR (2000). Subdiaphragmatic vagotomy blocks interleukin-1 beta-induced fever does not reduce IL-1 beta levels in the circulation. *Auton Neurosci*; 85: 72-77.
- Guerrero- Vargas NN, Salgado Delgado R, Basualdo M del C, García J, Guzmán Ruiz M, Carrero JC, Escobar C, Buijs RM (2014). Reciprocal interaction between the suprachiasmatic nucleus and the immune system tunes down the inflammatory response to lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol*; 2: 22-30.
- Gómez G, Escobar, A.(2006). La Psiconeuroinmunología: bases de la relación entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune. *Rev Mex Neuroci*; (1):30-38.
- Hansen J (2001). Increased breast cancer risk among women who work predominantly at night. *Epidemiology*. Cambridge, Mass; 12:74-77.
- Hart BL (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*; 12: 123-137.
- Halberg F, Johnson E, Brown B Bitter J (1960). Susceptibility rhythm to E.coli endotoxin and bioassay. *Proc Soc Exp Biol Med*; 103:142-144.
- Hayashi M, Shimba S, Tezuka M (2007). Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. *Biol. Pharma. Bull*; 30: 621-626.
- Henk A, Mariska JV, Stephan M, Gene DB, Johanna HM (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Cell Press*. 15:886-893.
- Hernández F, Santiago J (2010). Ritmos circadianos, genes reloj y cáncer. *Imed Pub J*. 6: 2-3
- Hernández ME, Becerril LE, Alvarez L, Romero L (2007). Vías de neuroinmodulación. Primera parte. *Salud Mental*. 30;13-19.
- Hernández ME, Becerril LE, Alvarez L, Romero L (2008). Vías de neuroinmodulación. Segunda parte. *Salud Mental*. 31;29-36.

- Hosoi T, Okuma Y, Matsuda T, Nomura Y (2005). Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation: possible role of nodose ganglion. *A Neurosci*; 120: 104-107.
- Iregui C y Hurtado S (2010). El lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*, No. 19: 37-45
- Janeway CA, Jr, Medzhitov R (1999). Lipoproteins take their toll on the host. *Curr Biol*; 9: 879-882.
- Janknecht R, Cahill MA, Nordheim A (1995). Signal integration at the c-Fos promoter. *Carcinogenesis*; 3: 443-450.
- Joly J, Osório J, Alunni A, Auger H, Kano S, Rétaux S (2007). Window of the brain; Towards a developmental biology of circumventricular and other neurohormal organs. Elsevier, *Seminar in Cell & Developmental Biology*; 18: 512-524.
- Johnson A, Gross P (1993). Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways-the FASEB Journal; 7: 678-686.
- Johnson JD, O'Connor KA, Hansen MK, Watkins LR, Maier SF (2003). Effects of prior stress on LPS-induced cytokine and sickness responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284: R422-R432.
- Keller M, Mazuch J, Abraham U, Eom GD, Herzog ED, Volk HD, Kramer A, Maier B (2009). A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A*; 106: 21407-21412.
- Konsman JP, Kelley K, Dantzer R (1999). Temporal and spatial relationship between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin- 1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain: *Neurosci*; 89: 535-548.
- Krueger JM, Obal F, Fang J, Kubota T, Taishi P (2001). The role of cytokines in physiological sleep regulation. *Ann NY AcadSci*; 933: 211-221.
- Laflamme N, Rivest S (2001). Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune responses triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J*; 15:155-163.
- Laflamme N, Rivest S (2001). Circulating cell wall components derived from gram-negative, not gram-positive, bacteria cause a profound induction of the gene-encoding Toll-like receptor 2 in the CNS. *J of Neurochemistry*, 79: 648-657.

- Leone MJ, Marpegan L; Chiesa J Golombek DA, (2007.) A time to kill and a time to heal. Pathophysiological interactions between the circadian and the immune systems. *Physiological Minireviews* 2; 10: 60-69
- Leone MJ, Marpegan L, Bekinschtein TA, Costas MA, Golombek DA (2006). Suprachiasmatic Astrocytes as an Interface for immune circadian signalling. *J Neurosci Res*; 84: 1521-1527
- Leone MJ, Marpegan L, Duhart JM, Golombek (2012). Role of proinflammatory cytokines on lipopolysaccharide induced phase shifts in locomotor activity circadian rhythm. *Chronobiology international informa healthcare*; 29(6):715-723.
- Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follet P, Jensen F, Rosenberg P, Volpe J, Vartanian T (2002). The Toll-Like Receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neuroscience*; 7: 2478-2486.
- Maier SF, Watkins LR (1998). Cytokines for psychologists: Implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychological Review*; 105: 83-107
- Maldonado G, Juárez I, Salazar G, Castillo A (2011). Cronobiología: correlatos básicos y médicos. *Revista del Hospital General de México*. 74 (2):108-114.
- Marpegan L, Bekinschtein T, Costas M, Golombek D (2005). Circadian responses to endotoxin treatment in mice. *J of Neuroimmunology*; (160): 102-109.
- Marpegan L, Leone MJ, Katz ME, Sobrero PM, Berkinstein TA, Golombek DA (2009). Diurnal variation in endotoxin-induced mortality in mice: correlation with proinflammatory factors. *Chronobiology International*; 26(7): 1430-1441.
- Marvel FA, Chen CC, Badr N; Gaykema RP, Goehler LE (2004). Reversible inactivation of the dorsal vagal complex blocks lipopolysaccharide-induced social withdrawal and c-Fos expression in central autonomic nuclei. *Brain Behav. Immun*; 18: 123-134.
- Mikkelsen JD, Larsen PJ, Mick G, Vrang N, Ebling FJ, Maywood ES, Hastings MH, Moller M (1995). Gating of retinal inputs through the suprachiasmatic nucleus: role of excitatory neurotransmission. *Neurochem.Int*; 27: 263-272.

- Montero C (2003). The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *The J of Histochemistry*; 1: 1-4.
- Moore RY, Spech JC, Card JP (1995). The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol*; 352:351-366.
- Moore RY, Crad JP (1994). Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol*; 344: 403-430.
- Moore RY, Lenn NJ (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol*; 146: 1-14
- Moore RY, Speh JC (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* 150: 112-116.
- Moore RY, Speh JC, Leak RK (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res*. 309: 89-98.
- Nemec P, Burda H, Helmut HA, Oelschlager HA (2005). Towards the neuronal basis of magnetoreception a neuroanatomical approach. *Naturwissenschaften*; 92: 151-157.
- Paladino N, Leone MJ, Plano SA, Golombek D (2010). Paying the circadian toll: the circadian response to LPS injection is dependent on the Toll-like receptor 4. *J of Neuroimmunology*; 225: 62-67
- Palomba M, Bentivoglio M (2008). Chronic inflammation affects the photic response of the suprachiasmatic nucleus. *J of Neuroimmunology*; 193: 24-27.
- Paxinos G, Watson C (2007). *The rat brain on stereotaxic coordinates*. Editorial Elsevier. Séptima Edición.
- Pickard GE (1985). Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *NeurosciLett*; 55:211-217.
- Petrovsky N, Harrison LC (1997). Diurnal rhythmicity of human cytokine production: a dynamic disequilibrium in T helper cell type 1/T helper cell type 2 balance. *Immunol* 158; 5163-5168.
- Petrovsky N, Harrison LC (1998). The chronobiology of human cytokine production. *Int Rev Immunol*, 16: 635-49.

- Ramos JA (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*; 42: 405-426.
- Rabin BS, Ganguli R, Lysle DT, Cunnick JE (1990). Interaction between brain and the immune system. *Immunology Series*; 52:125-154.
- Reppert S, Weaver D (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*; 418:935-941.
- Rojas W, Anaya JM, Aristizábal B, Cano LE, Gómez LM, Lopera, D (2007). *Inmunología de Rojas*. 14ª edición, Medellín Colombia.
- Romanovsky AA (2000). Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: lessons from vagotomy. *Auton neurosci*, 85:39-48.
- Romanovsky AA, Sugimoto N, Simons Ct, Hunter WS (2003). The organum vasculosum laminae terminalis in immune-to-brain febrile: a reappraisal of lesion experiments. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 85: 420-428.
- Rivest S (2003). Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain, behavior and immunity minireview*; 17: 13-19
- Salgado R, Fuentes B, Escobar C. (2009). La desincronización interna como promotora de enfermedad y problemas de conducta. *Salud Mental*; 32:69-76.
- Sadki A, Bemtivoglio MK, Nygard M (2007). Suppressors, receptors and effects of cytokines on the aging mouse biological clock. *Neurobiol Aging*; 28: 296-305.
- Sagar SM, Price KJ, Kastig NW, Sharp FR (1995). Anatomic patterns of Fos immunostaining in the rat brain following systemic endotoxin administration. *Brain Res Bull*; 56: 381-392.
- Sánchez P, Sanz M, Martín A, Soto M, García M (2005). Balance entre citocinas pro y antiinflamatorias en estados sépticos. *Med Intensiva*; 29:151-158.
- Schwarz JM, Bilbo SD (2012). The immune system and developing brain. Morgan y Claypool Life Sciences, colloquium series on the developing brain.
- Segura M, García R, Padrón Y, Abraham C (2007). Estrés y sistema Inmune. *Revista cubana de Hematología*; version online; ISSN 1561-2996
- Sing AK, Jiang Y (2004). How does the peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the rat brain of rats? *Toxicology*; 201; 197-207.

- Steinman L. (2004). Elaborate interactions between the immune and nervous Systems. *Nature immunology reviews*;6: 575-581.
- Suzuki S, Toyabe S, Moroda T, Tada Y, Tsukahara A, Iiai T, Minagawa M, Maruyama S, Hatakeyama K, Endoh K, Abo T (1997). Circadian rhythm of leucocytes and lymphocytes subsets and its possible correlation with the function of the autonomic nervous system. *Clin. Exp. Immunol*; 110: 329-338.
- Szelényi J (2000). Cytokines and the central nervous system. *Brain Research Bulletin*, Elsevier; vol 54 no.4: 329-338.
- Takane H, et al (2002). Relationship between 24-hour rhythm in antiviral effect of interferon-beta and interferon alpha/beta receptors expression in mice. *Japanese J of pharmacology*; 90:304-312.
- Tamminga CA (1997). Immediate Early Genes. *Am J Psychiatry*; 154: 3-6.
- Tracey KJ (2002). The inflammatory reflex. *Nature*. 420; 853-859.
- Vandesande F, Dierick K (1975). Identification of the vasopressin producing and of the oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. *Cell Tissue Res*; 164: 153-162.
- Wang X, Reece SP; Van Scott MR, Brown JM (2011). A circadian clock in murine bone marrow-derived mast cells modulates IgE-dependent activation in vitro. *Brain Behav. Immun*; 25: 127-134.
- Watkins LR, Maier SF, Goehler LE (1995). Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sci*; 57: 1011-1026.
- Wuchert F, Ott D, Murgott J, Rafalzik S, Hitzel N, Roth J, Gerstberger R (2008). Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor- 4 agonist lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol*; 204: 66-74.
- Xu S, Guo S, Jiang X, Yin Q, Umezawa T, Hisamitsu T (2003). Effect of indomethacin on the c-fos expression in AVP and TH neurons in rat brain induced by lipopolysaccharide. *Brain Research*; 966: 13-18.
- Young MR (1995). Circadian rhythmometry of serum interleukin-2, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte macrophage colony stimulating factor in men. *Chronobiol Int* 12:19-27.

ANEXO

Preparación de reactivos para fijar tejidos:
(Perfusión)

PARAFORMALDEHÍDO 4%

11.5g Na₂HPO₄ (pm 141.96) o bien 28.6g si es Na₂HPO₄. 12 H₂O
o 14.41g si es Na₂HPO₄. 2 H₂O

40g de paraformaldehído

2.62g NaH₂PO₄.H₂O o bien 2.27 g de NaH₂PO₄ anhidro

Procedimiento:

1. Disolver en 250 ml de agua el fosfato básico (Na₂HPO₄) con el paraformaldehído agitando con calentamiento (hasta 65°C) hasta que se vea clara la solución
2. Agregar el NaH₂PO₄ y completar a 1000ml.
3. El PH debe ser 7.2

SOLUCIÓN SALINA 0.9%

9 g de NaCl para 1000 ml de agua.

SACAROSA AL 30%

Sacarosa 300g

Azida de sodio 1g

Aforar a 1000 ml de agua destilada

Inmunohistoquímica para secciones de cerebro

1. Una vez obtenidos los cortes de 40 μm , se lavó con Buffer de fosfato salino (PBS) en los recipientes de acrílico para lavado
2. Se rotularon adecuadamente las placas de 12 pozos y se colocaron las secciones usando un agitador de vidrio. Se agregó un mililitro de anticuerpo primario diluido
3. Se incubaron los cortes 1hr a temperatura ambiente con agitación (+/- 100 RPM). Posteriormente se dejaron en el cuarto frío (4°C) con agitación lenta.
4. Se lavaron 3 veces con PBS por 5 min cada vez en los recipientes de acrílico
5. Se pasaron nuevamente las secciones a la placa y se puso el segundo anticuerpo biotinilado según la especie que corresponda al primero. Se incubaron una hora y media a temperatura ambiente con agitación
6. Se lavó como en el paso 5 y se volvieron a pasar las secciones a la placa
7. Unos 30 minutos antes, se mezcló el reactivo A con el B 1:1 del kit ABC (complejo biotina-avidina) usando solo un poco del total del buffer necesario. Esto con el fin de formar el complejo biotina-avidina antes de ponerle en contacto con los anticuerpos fijados en las secciones
8. Se completó el reactivo ABC con el buffer y se puso 1 ml a cada pozo
9. Se incubó 1 hora con agitación lenta a temperatura ambiente
10. Se lavó como en el paso 5 y se revelaron con diaminobenzidina DAB (0.01%), solución de Níquel (Sigma A 1827 Sulfato de amonio y níquel) (0.5 ml de una solución al 10%) y 15 μg de H₂O₂ de 30 vol para 100 ml de DAB. Se dejó revelar por aproximadamente 10 min. No menos de 6 min.
11. Para detener la reacción de revelado se lavaron los cortes con PBS 3 veces por 2 o 3 min cada vez.

REACTIVOS NECESARIOS

Buffer de dilución (Supermix)

| | |
|--------------|-------|
| PBS pH 7.6 | 100ml |
| Gelatina | 0.25% |
| Triton X 100 | 0.5% |

PBS 0.01M pH 7.6

DAB

Buffer de TBS 0.05M pH 7.6

DAB

Agua oxigenada 30V

Solución de níquel al 10%

TBS 10 X pH 7.6 para 1lt

Tris base 60.5g (0.5M) (121 g para 2lts de stock 10X)

NaCl 88 g (1.5M) (176 g para 2 lts de stock 10X)

Ajustar el pH con HCl concentrado y al diluir reajustar el pH