



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**LA DENERVACION HEPÁTICA COMO HERRAMIENTA PARA
ESTUDIAR LAS INTERACCIONES ENTRE EL SISTEMA INMUNE
Y EL CEREBRO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLÓGA

P R E S E N T A:

REBECA IRIS FUENTES ROMERO

DR. RUDOLF MARINUS BUIJS

2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hojas de datos del jurado

1. Datos del alumno
Fuentes
Romero
Rebeca Iris
305035950
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
2. Datos del tutor
Doctor en Neurociencias
Rudolf Marinus
Buijs
3. Datos del sinodal 1
Doctora en
Alette
Gómez
Ortega
4. Datos del sinodal 2
Doctora en Ciencias
Elsa Guadalupe
Escamilla Chimal
5. Datos del sinodal 3
Maestro en ciencias
Enrique
Moreno
Sáenz
6. Datos del sinodal 4
Bióloga
Natalí Nadia
Guerrero Vargas
7. Datos del trabajo escrito
La denervación hepática como herramienta para estudiar las interacciones entre el sistema inmune y el cerebro.
2013

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO CON EL APOYO DE CONACYT Y PAPIT.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Buijs por permitirme trabajar en el laboratorio.

A Natalí por ser una excelente y paciente maestra, que dedicó gran parte de su tiempo en este trabajo.

A Mara por su apoyo y consejos. Mi estancia en el laboratorio no hubiese sido la misma sin su energía.

A todos mis compañeros de laboratorio, en especial a Maricarmen Basualdo así como a Liz por su aporte para este trabajo.

A los sinodales por sus consejos y tiempo dedicado a la revisión.

DEDICATORIA

A mis excelentes padres, por su apoyo incondicional y su cariño. Los amo mucho.
A mis hermanos Nayeli y Jorge por ser mis confidentes y compañeros de vida. A Val que es una alegría en mi vida.

A mis amigos, en especial a Ernesto, Daniel y César, lo mejor de mi licenciatura, sin ustedes no sería Bióloga.

A W. Roberto por estar ahí

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1.1. Sistema Inmune.....	2
2.1.2. Innato y Adaptativo.....	3
2.1.2. Tipo de respuesta a patógenos.....	5
2.1.3. Citocinas.....	6
2.1.4. Fiebre.....	7
2.2. Sistema Nervioso Central.....	8
2.2.1. Sistema Nervioso Autónomo.....	8
2.2.2. Reflejo Anti-inflamatorio.....	10
2.3. Interacción entre el Sistema Inmune y el Sistema Nervioso Central	
2.3.1. Vías de entrada.....	12
2.3.2. Vías de salida.....	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
4. HIPOTÉISIS.....	17
5. OBJETIVO.....	18
6. MATERIAL Y MÉTODO.....	19
6.1. Animales.....	19
6.2. Denervación hepática.....	19
6.3. Cánula Intrayugular.....	21
6.4. Reto Inmunológico.....	21
6.5. Inmunohistoquímica.....	23
7. RESULTADOS.....	26
8. DISCUSIÓN.....	38
9. CONCLUSIÓN.....	43

ABREVIATURAS

ACh: Acetilcolina

ACTH: Hormona Adrenocorticotropica

AP: Área postrema

C.D.: Completamente Denervados

CRH: Hormona liberadora de Corticotropina

CVOs: Órganos Circumventriculares

DAB: Diaminobenzidina

DMV: Dorsomotor del vago

DVC: Complejo dorsovagal

GAPDH: Glicer aldehído 3-fosfato Deshidrogenasa

HPA: Eje Hipotálamo Hipofísis Adrenal

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-12: Interleucina 12

LPS: Lipopolisacárido

NA: Noradrenalina

NE: Norepinefrina

NTS: Núcleo del Tracto Solitario

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: Amortiguador de Fosfatos salino

PGE₂: Prostaglandina

PVN: Núcleo Paraventricular

SI: Sistema inmune

SNA: Sistema Nervioso Autónomo

SNC: Sistema nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Parasimpático

SNS: Sistema Nervioso Simpático

TBS: Amortiguador salino Tris

TLR4: Toll-like receptor tipo 4

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

1. RESUMEN

El sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmune (SI) responden de manera coordinada ante el peligro de una infección. La interacción entre el SI y el cerebro involucra cambios fisiológicos inducidos por los patógenos que ingresan a nuestro cuerpo. La hipótesis de este trabajo fue que el cerebro y el sistema inmune interactúan de manera recíproca para organizar una respuesta a un posible riesgo de infección. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios que se dan en diferentes parámetros de funcionamiento del cerebro y el hígado en ratas donde la comunicación entre el hígado y el cerebro a nivel vagal (parasimpático y simpático) fue interrumpida de manera quirúrgica (denervación). Después de administrar un reto inmunológico moderado (Lipopolisacárido, LPS; 1.6µg/kg) a ratas macho de la cepa Wistar, se evaluó la producción de citocinas en sangre y además se analizó la actividad neuronal en distintas áreas dentro del cerebro utilizando la técnica de inmunohistoquímica para la proteína c-Fos, la cual es un producto del gen de reacción inmediata. Nuestros resultados indican que los animales denervados responden con una producción exacerbada (tres veces mayor a la del control) de citocinas plasmáticas (IL-6, TNF-α) en respuesta al reto inmune administrado. La expresión de TLR4 (receptor relacionado específico para LPS) aumentó en los hígados de los animales denervados luego de la administración de LPS. La expresión de c-Fos en los cerebros de los animales denervados en respuesta al LPS, aumentó en los órganos circumventriculares indicando activación de la vía humoral. La expresión de c-Fos en animales denervados tratados con LPS también aumentó en el núcleo del tracto solitario (NTS) considerado como parte de la vía neural.

En conclusión nuestros resultados demuestran que la denervación hepática, sensibiliza al organismo de manera que responde de forma exacerbada ante un reto inmune moderado, indicando que el SNC y el SI trabajan en conjunto a través del hígado para regular la respuesta inmune.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. SISTEMA INMUNE

En algunas especies como los humanos o roedores existe un sistema de defensa, el cual surgió por evolución para protegerlos ante cualquier agente patógeno que ingresara al cuerpo. Este sistema, llamado Sistema inmune (SI), es capaz de generar una enorme variedad de células y moléculas capaces de reconocer y eliminar específicamente agentes extraños (Kuby *et al.*, 2007).

El primer obstáculo para un patógeno son las llamadas barreras mecánicas las cuales protegen al organismo, estas son la piel, las mucosas, la acidez del contenido estomacal y el sudor (Kuby *et al.*, 2007). Una vez que éstas barreras mecánicas son traspasadas por los patógenos, la protección conferida por el sistema inmune ocurre a través de sus órganos, en los cuales se generan, maduran e interactúan las células que lo conforman. Los órganos inmunes se dividen en primarios y secundarios. Los primarios son: la médula ósea, en donde se producen todas las células del sistema inmune y el timo, donde maduran y se selecciona una sub-población de linfocitos (glóbulos blancos) conocidos como linfocitos T (Rojas, 2007).

Los órganos inmunes secundarios son el bazo, el hígado y los ganglios linfáticos, en éstos la información de los microorganismos que llegan al cuerpo es detectada principalmente por los macrófagos, que son células con la capacidad de fagocitar materiales extraños e iniciar la respuesta inmune. Los macrófagos residen en los órganos inmunes o se encuentran diseminados en los tejidos conjuntivos (Kumar V., 2008).

El hígado es un órgano que juega un papel importante en la eliminación de las infecciones bacterianas de la sangre; los macrófagos residentes del hígado (células de Kupffer) (Baumann y Gauldie, 1994) que se encuentran en el área periportal en los sinusoides hepáticos (Kuby *et al.*, 2007) tienen el primer contacto con las bacterias, endotoxinas y detritos derivados de la vía gastrointestinal a través de la vena porta.

Entre los órganos secundarios, el bazo por medio de sus macrófagos residentes “filtra” la sangre para limpiarla de patógenos. La sangre que llega a los ganglios linfáticos, lleva la información capturada por las células fagocíticas como los macrófagos, monocitos y células dendríticas, en la piel o en las mucosas (Rojas, 2007). Éstas células llevarán a cabo dos actividades vinculadas: el reconocimiento y la respuesta (Kuby *et al.*, 2007).

El reconocimiento es la capacidad que presenta el sistema inmunitario de distinguir entre invasores y agentes endógenos. Este proceso comienza mediante la distinción de patrones moleculares que caracterizan a grupos de patógenos comunes. El reconocimiento desencadena una variedad de reacciones o respuestas efectoras. Por el tipo de respuesta a estos patógenos el sistema inmune se definirá en innato y adaptativo (Rojas, 2007).

2.1.1. SISTEMA INMUNE INNATO Y ADAPTATIVO

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa, impide la mayoría de las infecciones desde su inicio, no es específica a patógenos en particular sino que reconoce secuencias conservadas entre los patógenos (Rojas, 2007). Las diversas células que se encargan de orquestar la respuesta inmune innata son los fagocitos demostrados por Mechnikov en 1882 (Rojas, 2007) entre los cuales tenemos a los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos y eosinófilos (Fig.1) (Schwarz, 2012). Estas células fagocíticas reconocen los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como lo son el Lipopolisacárido (LPS), los peptidoglicanos, los ácidos lipoprotéicos, el DNA bacteriano y el RNA de glucanos que se expresan en la membrana de los microorganismos patógenos (Rojas, 2007).

Por otro lado, la inmunidad adaptativa es la segunda línea de defensa, se desarrolla a partir de la inmunidad innata y es llevada a cabo una vez que los patógenos logran persistir a pesar de ésta (Kuby *et al.*, 2007).

La inmunidad adaptativa responde a retos antigénicos específicos, requiere de varios días para desarrollarse y su característica más importante es la generación

de memoria, la cual desde la segunda exposición al mismo antígeno resulta en una respuesta inmune más acelerada y específica (Berczi *et al.*, 1998). Las células que median los atributos inmunitarios definitorios de especificidad, diversidad, memoria y autoreconocimiento son los linfocitos, los cuales son clasificados por su lugar de maduración en B (derivados de médula ósea) o T (derivados del timo) (Schwarz, 2012) Fig. 1.

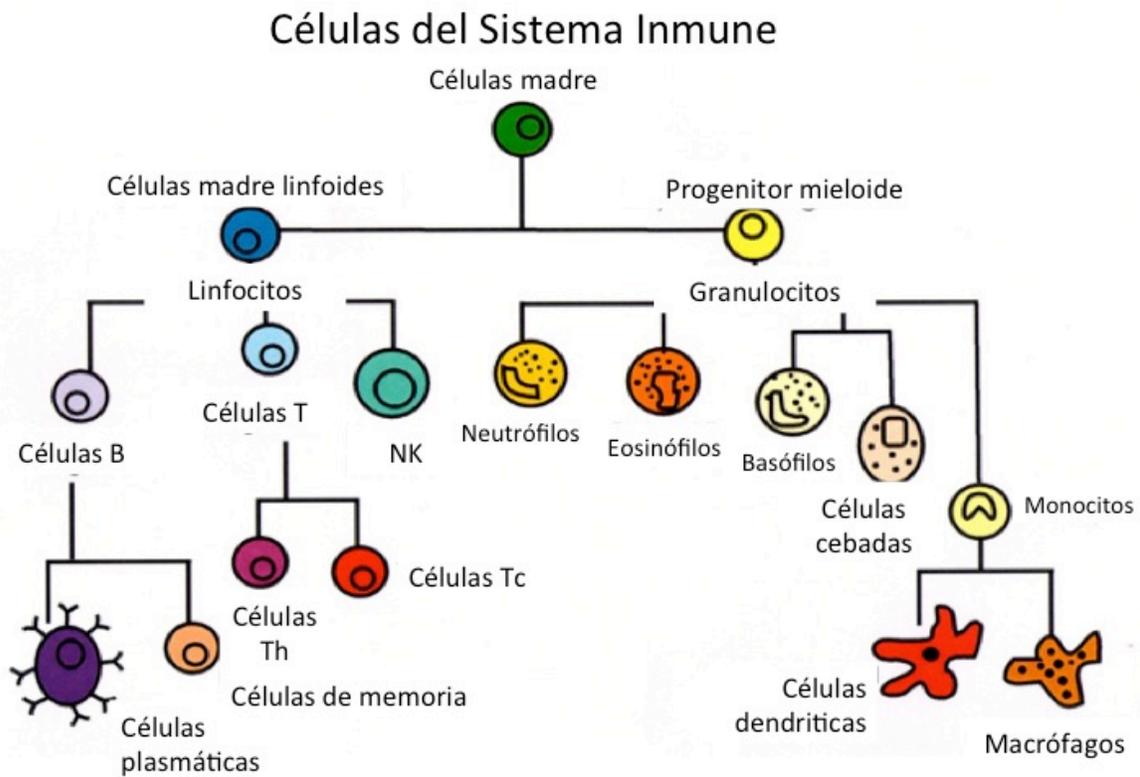


Figura 1. Células del sistema inmune innato y adaptativo. Origen y diferenciación.

2.1.2. TIPOS DE RESPUESTA A PÁTOGENOS

Un reto inmunológico ampliamente utilizado para activar la respuesta inmune innata es mediante el lipopolisacárido (LPS) (Janeway y Medzhitov, 1999) un agente inmuno-activo constituyente principal de la pared celular de las bacterias Gram-negativas; su parte tóxica, el lípido A, es reconocido por los macrófagos y otros tipos celulares que expresen su receptor específico, lo que les permite responder a éste sin haber estado previamente expuestos (Schwarz, 2012). El receptor específico para el LPS es el receptor Toll tipo 4 (TLR-4); la unión del LPS con su receptor, desencadena la señalización intracelular, translocación de la proteína nuclear y activación del factor de transcripción NF- κ B, asociado a genes del proceso inflamatorio, además, se induce la síntesis de citocinas proinflamatorias (Beutler y Poltorak, 2000). Dicha respuesta es de carácter agudo, y es llamada respuesta inflamatoria (Schwarz, 2012).

La respuesta inflamatoria aguda puede iniciarse por estímulos infecciosos, físicos o traumáticos (Rojas 2007). Combate las primeras fases de una infección y se caracteriza por vasodilatación, lo que resulta en el incremento del volumen sanguíneo en la zona afectada, la sangre calienta el tejido y lo hace enrojecer. También se eleva la permeabilidad vascular, se adhieren leucocitos a las células endoteliales dentro de la región inflamada para fagocitar los patógenos invasores y liberar los mediadores moleculares que contribuyen a la reacción inflamatoria y a la activación de las células efectoras (Kuby *et al.*, 2007).

Entre los mediadores moleculares del proceso inflamatorio, se encuentran las citocinas que son proteínas solubles de bajo peso molecular, las cuales son secretadas por distintas células no exclusivas del sistema inmune. Las citocinas no se almacenan en forma de moléculas preformadas, su síntesis la inicia la transcripción de un gen tras la activación celular. Una vez sintetizadas, las citocinas se secretan con rapidez; la intensidad de la liberación dependerá de la magnitud de la infección (Abbas y Pilai, 2012).

2.1.3. CITOCINAS

Las citocinas se clasifican por su función en: citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (Maskin, 2007). Las principales citocinas pro-inflamatorias son: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), las interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y los interferones; las citocinas son secretadas por los macrófagos y tienen efectos locales que ayudan a atraer a neutrófilos, linfocitos y células “asesinas naturales” (NK, por sus siglas en inglés) entre otras células inmunes al sitio de infección, resultando en efectos sistémicos que dan lugar a la inmunidad adaptativa (Janeway *et al.*, 2003).

Las citocinas reguladoras (anti-inflamatorias: IL-10 e IL-11, entre otras) tienen un papel atenuador cuando la respuesta inmune llega a ser exagerada. La liberación de estos mediadores son necesarios para que la homeostasis del cuerpo sea restaurada (Rojas 2007; Janeway *et al.*, 2003). Las citocinas pueden actuar de manera autocrina, afectando el comportamiento de la propia célula, de manera paracrina, afectando el comportamiento de células adyacentes y de forma endocrina actuando en células distantes. (Janeway *et al.*, 2003).

Mediante la producción de diversas citocinas pro-inflamatorias por los macrófagos circulantes y residentes en cada tejido (hígado, bazo, timo, pulmón, etc.), se orquestan una serie de cambios fisiológicos en el animal, incluyendo cambios a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) (Dantzer *et al.*, 1998a). Entre los cambios fisiológicos provocados por las citocinas se incluyen una defensa cerebral, llamada “*Sickness behaviour*” la cual se caracteriza por un aumento de la temperatura corporal (fiebre), aumento de sueño (somnia), pérdida del apetito (anorexia), pérdida de peso e hiperalgesia (Marvel *et al.*, 2004).

2.1.4. FIEBRE

Como mencionamos anteriormente, la fiebre se caracteriza por el aumento de la temperatura corporal; la cual se encuentra controlada por el SNC. La temperatura puede variar durante una infección ya que ayuda al sistema inmune a combatir las infecciones mediante el aumento en la actividad de los leucocitos y la inhibición del crecimiento de los microorganismos (Rojas, 2007). El control y mantenimiento de la temperatura se realiza mediante mecanismos controlados por el sistema nervioso, que consiguen mantenerla estable por medio de un equilibrio de ganancia y pérdida de calor.

Ya que la temperatura está regulada centralmente y que los patógenos invaden el cuerpo por las barreras naturales, se presume que los mediadores pirogénicos están en la periferia y son transportados por la circulación hacia el cerebro (Blatteis, 1992). Existe un número de sustancias exógenas capaces de provocar fiebre y otros síntomas controlados por el cerebro cuando se inyectan sistémicamente en animales experimentales. Los agentes que inducen fiebre son llamados pirógenos exógenos (Bacterias, virus, toxinas etc.). Todos estos agentes inducen la producción y liberación de proteínas inmunoregulatorias: las citocinas pro-inflamatorias. Se ha propuesto que las citocinas circulatorias son los mediadores endógenos de la fiebre en respuesta a la administración de pirógenos exógenos (Roth y De Souza, 2001). Esto se ha estudiado a partir de la evaluación de la aparición de las citocinas en la circulación, la cual es más o menos simultánea al desarrollo de la fiebre luego de la inyección de un pirógeno exógeno como el LPS. Dependiendo de la ruta y la dosis, TNF- α es la primera citocina que aparece en la circulación, seguida de las interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8). Esta cascada de citocinas se observa en respuesta tanto a las bacterias Gram negativas así como a las bacterias Gram positivas (Tracey, 2002). Sin embargo, en la respuesta a agentes patógenos existe una mejor correlación con los niveles de IL-6 y los cambios en la temperatura (fiebre) que con otras citocinas.

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que las células endoteliales al entrar en contacto con las citocinas pirógenas endógenas que circulan en la

sangre, liberan metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandina E₂) provocando fiebre (Fauci, 1998); así, se cree que la prostaglandina E₂ (PGE₂) actúa como un mediador en la región hipotalámica preóptica que al poseer neuronas termosensibles integra respuestas fisiológicas y conductuales relacionadas con la termorregulación corporal. Este control termoregulatorio que ayuda a aumentar la temperatura y a mantener el curso de la fiebre se lleva a cabo mediante respuestas autonómicas (Romanovsky *et al.*, 1997).

2.2. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El Sistema Nervioso está compuesto de sistemas sensoriales que detectan el estado del cuerpo así como el estado de los órganos, así como por el Sistema Nervioso Central quien integra las señales provenientes de la periferia y genera una respuesta utilizando sistemas motores que transmiten señales hacia el cuerpo y los órganos. Mientras el sistema somático motor controla los movimientos voluntarios, el sistema autónomo controla las funciones viscerales e inerva a las glándulas (Forsythe, 2009; Tracey, 2002).

El sistema nervioso central puede monitorear la activación inmune en las etapas cruciales de una respuesta emergente. El sistema nervioso actúa periféricamente para regular el sistema inmune a través de dos mecanismos: la respuesta hormonal, dirigida principalmente por el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) (Forsythe, 2009) y el sistema nervioso autónomo.

2.2.1. SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO

Como lo mencionamos previamente, la segunda vía principal por la cual el SNC puede actuar directamente en la respuesta inmune es por medio del Sistema Nervioso Autónomo (Sternberg, 2006; Kin y Sanders, 2006; Wrona, 2006), con sus dos divisiones principales: el sistema simpático (nor-adrenérgico) y el sistema parasimpático (colinérgico). Estos sistemas se originan en el SNC con cuerpos

celulares en el tallo cerebral y la médula espinal; a través del nervio vago y las fibras simpáticas, el sistema nervioso autónomo inerva a los principales órganos inmunológicos como son el hígado, el bazo, el timo y la piel. (Steinman, 2004).

Los dos sistemas algunas veces funcionan en conjunto y otras veces contra puestos. El sistema nervioso autónomo actúa en el hipotálamo (controlando la liberación de hormonas del estrés), en el tallo cerebral (controlando la frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria), así como con el sistema límbico (influyendo la formación de memoria).

El *sistema nervioso simpático (SNS)* está relacionado con actividad o estrés; ésta transmisión nerviosa se lleva a cabo mediante el neurotransmisor adrenalina o noradrenalina (NA). Existen diferentes tipos de receptores para la adrenalina (α y β), los cuales pueden causar: un aumento en la frecuencia y excitabilidad cardíaca, vasoconstricción y midriasis (dilatación de pupilas) entre otros (Duran, 2008). El SNS regula la inmunidad a un nivel regional a través de la inervación de los órganos inmunes (Nance y Sanders, 2007). Su regulación puede ser pro-inflamatoria o anti-inflamatoria (Elenkov *et al.*, 2000). Durante la respuesta inmune adaptativa, las señales del cerebro se transmiten por la activación de las fibras eferentes del SNS (Forsythe, 2009) a los órganos periféricos inervados (Sternberg *et al.*, 2007).

El *sistema nervioso parasimpático (SNP)* es predominante en situaciones de reposo y asimilación de energía en el organismo. La transmisión nerviosa se lleva a cabo a través del neurotransmisor acetilcolina (ACh). Los receptores preganglionares se denominan nicotínicos, debido a que la nicotina tiene efectos agonistas sobre ellos. Los receptores a nivel de los órganos efectores se denominan muscarínicos debido a que la muscarina (producto tóxico de la seta *Amanita muscaria*) estimula estos receptores. La unión de la acetilcolina a sus receptores en el órgano efector produce disminución de la frecuencia cardíaca, vasodilatación, bronco-constricción, relajación del esfínter y miosis entre otros. El papel del SNP en la modulación inmune posee un carácter anti-inflamatorio que

ocurre a través del nervio vago; el funcionamiento del mecanismo se describirá a continuación.

2.2.2. REFLEJO INFLAMATORIO

Estudios de Tracey y colaboradores (2002) resaltaron el papel de la vía parasimpática en la inmunoregulación. Las fibras vagales contienen componentes sensoriales que controlan diversas funciones de los órganos como la frecuencia cardíaca y la digestión (Borovikova *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003). Además de estas funciones clásicas, el nervio vago 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, 2009).

Estudios previos demuestran que la ablación del nervio vago (vía parasimpática) después de la administración de LPS (Bluthé *et al.*, 1994; Bret-Dibat *et al.*, 1995; Watkins *et al.*, 1994) evita que la comunicación entre el SI y el SNC se lleve a cabo de manera eficiente, eliminando o atenuando fuertemente los síntomas del “sickness behaviour” (Blatteis, 1992); aunado a esto se observó que la excitación de este nervio en estado de endotoxemia (presencia de endotoxinas en torrente sanguíneo) atenúa el estado inflamatorio (Borovikova *et al.*, 2000), proponiendo así un mecanismo neural que controla la inflamación, denominado “reflejo inflamatorio vagal ” o bien “vía colinérgica-anti-inflamatoria” Fig. 2 (Tracey, 2002).

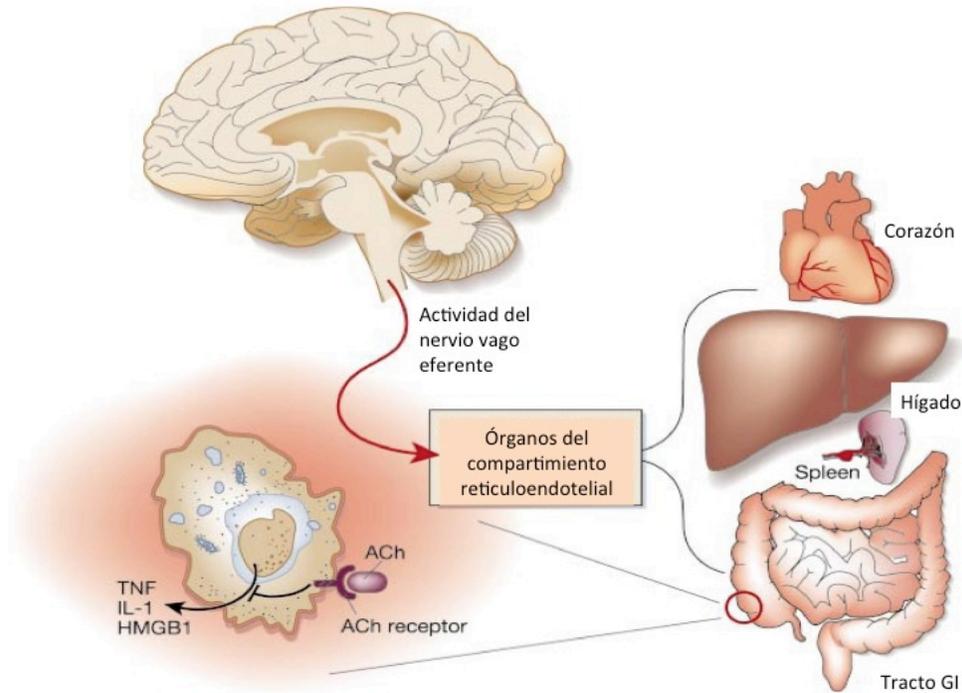


Figura 2. El reflejo inflamatorio. La liberación de acetilcolina (ACh) interactúa con los receptores nicotínicos en los macrófagos, de los órganos del sistema reticuloendotelial (hígado, corazón, bazo y tracto gastrointestinal) que inhiben la liberación de TNF, IL-1 y otras citocinas. Imagen modificada de Tracey 2002.

El reflejo anti-inflamatorio se lleva a cabo a través de la unión del neurotransmisor parasimpático Acetilcolina (ACh) a la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico presente en los macrófagos (Borovikova *et al.*, 2000), provocando la inhibición de los mecanismos post-transcripcionales como la vía del factor de transcripción NF- κ B, que como ya se mencionó, interviene en la síntesis de citocinas proinflamatorias, como la IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Los niveles de las citocinas antiinflamatorias como la IL-10, no se ven afectados por medio de este reflejo (Berthoud y Neuhuber, 2000; Borovikova *et al.*, 2000).

En este mecanismo, la vía neural básica que monitorea y ajusta la respuesta inflamatoria, previene el derrame de productos de la inflamación hacia la circulación. El proceso inflamatorio debe de ser perfectamente regulado, debido a que las deficiencias o excesos en éste pueden causar la muerte.

De esta manera, el sistema nervioso integra la respuesta, reúne información acerca de los eventos invasivos locales y moviliza las defensas (Tracey, 2002). El mecanismo de las neuronas colinérgicas y su papel en la inhibición de la inflamación aguda ha expandido el conocimiento de cómo el sistema nervioso puede modular al sistema inmune.

2.3. INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA INMUNE Y EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Diversos estudios han establecido que el sistema inmune y el sistema nervioso central colaboran a través de interacciones bidireccionales para facilitar el control requerido para mantener la homeostasis del cuerpo (Sternberg, 2006; Tracey, 2002). Alteraciones en estos dos sistemas pueden resultar en procesos de inmunodeficiencia que pueden culminar en una infección, cáncer o una respuesta inmune excesiva causando desordenes como la artritis reumatoide, enfermedad de Crohn's, arteroesclerosis, diabetes, Alzheimer, esclerosis múltiple y asma (Forsythe, 2009).

El cerebro monitorea de forma continua el estado de la respuesta inmunológica y detecta las respuestas inflamatorias periféricas a través de dos vías: la neural y la humoral (Elmqvist *et al.*, 1997; Watkins *et al.*, 1995)

2.3.1. VÍAS DE ENTRADA

Como se describió anteriormente, el reflejo anti-inflamatorio es una evidencia de la interacción regulatoria entre el sistema inmune y el sistema nervioso central. En éste, la vía por la cual la información de la periferia puede llegar al cerebro es la llamada vía neural, la cual se encuentra modulada por el sistema nervioso parasimpático (SNP). El mecanismo neural participa en la activación de las fibras sensitivas aferentes del nervio vago, que indican al cerebro que la inflamación está ocurriendo. Dicho mecanismo percibe la activación por las citocinas producidas por células dendríticas y macrófagos así como otras células inmunológicas

asociadas al nervio vago (Schwarz, 2012), el principal nervio del sistema nervioso parasimpático, el cual contiene fibras (80 % de ellas son aferentes) que llevan las señales de la periferia hacia el cerebro (Schwarz, 2012). En esta vía, las citocinas pro-inflamatorias que son liberadas por las células inmunes periféricas en respuesta a un reto inmunológico (Janeway y Medzhitov, 1999), son captadas por sus receptores en la periferia enviando su señal al cerebro y a través de éste.

Se sabe que la rama hepática del nervio vago, es una ruta de transducción sistémica inflamatoria y pirogénica que señala al cerebro (Maier *et al.*, 1998); (Romanovsky, 2000). Las fibras aferentes del vago visceral, situadas en el ganglio nodoso, terminan principalmente dentro del complejo dorsal vagal (DVC, por sus siglas en inglés). El DVC está constituido por el núcleo del tracto solitario (NTS), el Núcleo Motor Dorsal del Vago (DMV) y el área postrema (AP) (Berthoud y Neuhuber, 2000; Maier *et al.*, 1998; Schwarz, 2012)

Por otra parte la segunda vía de entrada de la información inmunológica al cerebro es conocida como la vía humoral (Hansen *et al.*, 2001, Goehler *et al.*, 2000). En ésta, las citocinas pueden ejercer sus efectos en el cerebro directamente a través de su unión a sus receptores específicos presentes en los órganos circumventriculares (CVO'S) como son: el Órgano Vasculoso de la Lámina Terminalis (OVLT), el Órgano Subfornical (SFO), la Eminencia Media (EM), y el AP (Johnson, 2003). Estos núcleos se localizan a lo largo de la línea media de los ventrículos cerebrales en los vertebrados (Figura 3) (Joly *et al.*, 2007) y se caracterizan por presentar una barrera hematoencefálica pobre o ausente; 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. Ya sea por la liberación de citocinas desde el sitio de infección o por la inyección de las mismas (TNF- α , IL-6 *i.v.*; Goehler, 2000), las citocinas arriban a la circulación y de esta manera, pueden inducir la activación del SNC quien controla el "sicknes behavior" (Hansen *et al.*, 2001). Por lo tanto, las citocinas circulantes durante una infección son considerados como los

mensajeros de la señalización sistema inmune-cerebro en la vía humoral (Chings, 2007).

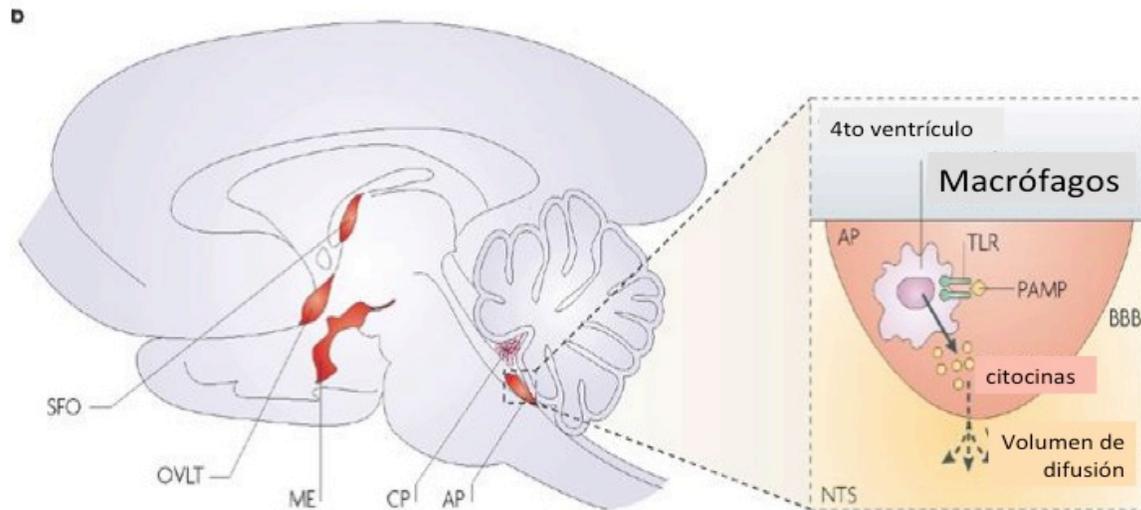


Figura 3. Vía humoral. Órganos circumventriculares con receptores para Lipopolisacárido (LPS) y Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP's). Imagen modificada de Dantzer, 2008.

De igual manera que las citocinas, la unión del LPS (uno de los antígenos más utilizados para inducir inflamación) con su receptor específico de tipo Toll (TLR4) puede activar al cerebro (Wuchert *et al.*, 2008). Los TLRs presentes en la microglia (macrófagos específicos del SNC, encontrados en los CVO's) activan la vía del factor de transcripción NF- κ B la cual promueve la transcripción de los genes que codifican para las citocinas pro-inflamatorias. Las vías humorales y neurales (principalmente vagales) están involucradas en la transmisión de la información periférica inmunológica hacia el cerebro (revisado en Goehler *et al.*, 2000).

Por otro lado, en el parénquima de los órganos linfoides primarios y secundarios se encuentran fibras simpáticas inervando la médula ósea y el timo (Felten *et al.*, 1992). Dentro de los tejidos secundarios, las terminaciones nerviosas simpáticas

se localizan primariamente en áreas abyacentes a células T en la cercanía de macrófagos y células B abyacentes a sinus (Felten *et al.*, 1992); (Panuncio *et al.*, 1999). Estudios *in vivo* en los cuales el SNS es eliminado químicamente (simpatectomía) o interrumpido quirúrgicamente cortando la inervación a los órganos linfoides indican que el SNS tiene un papel importante en la regulación de la inmunidad a nivel regional. Esta regulación ocurre principalmente por la interacción de noradrenalina y adrenalina ya que las células inmunes están equipadas para responder a señales adrenérgicas (Forsythe, 2009).

La Introducción de cualquier antígeno al cuerpo está asociada con la liberación de norepinefrina (NE) desde las terminales nerviosas simpáticas localizadas dentro del tejido linfoide. Una infección sistémica con LPS aumenta la tasa de liberación de NA en el bazo. Esto sugiere que el antígeno no activa directamente al SNS, pero lo requiere para la toma, el proceso, la presentación y la activación de las células inmunes y así producir citocinas. Estas citocinas (IL-1, IL-6 y TNF- α) se comunican con el cerebro o el sistema nervioso periférico para activar el SNS y libera NA para regular la actividad de las células inmunes. Evidencia que el cerebro está involucrado en regular la liberación de NA después de un reto inmune está dada por el hecho de el incremento en la actividad en terminales nerviosas simpáticas después de la exposición antígeno es parcialmente prevenida si se bloquea farmacológicamente la transmisión nerviosa del cerebro hacia la periferia (Kohm *et al.*, 2000).

2.3.2. VÍAS DE SALIDA

Como ya mencionamos anteriormente, durante una infección, las citocinas producidas por la activación del sistema inmune pueden actuar directamente en el cerebro a través de las proyecciones ascendentes del NTS, quienes reciben la información vagal de la periferia y proyectan a regiones del hipotálamo incluyendo el Núcleo Paraventricular (PVN) y así activan el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) (Berkenbosch *et al.*, 1987); (Bernardini *et al.*, 1990); (Sapolsky *et al.*, 1987). La activación de neuronas del PVN permiten la liberación de la hormona

liberadora de corticotropina (CRH) desde el hipotálamo, la cual estimula la expresión y liberación de la hormona adrenocorticotropica (ACTH) desde la pituitaria, induciendo la secreción de corticosteroides por las glándulas adrenales. Ambos CRH y ACTH pueden modular las células inmunes directamente; los glucocorticoides son los principales efectores del sistema neuroendocrino y tienen múltiples efectos en las células inmunes, principalmente efectos anti-inflamatorios (Schwarz, 2012). Sin embargo, también se ha demostrado que los glucocorticoides incrementan el número de neutrófilos (Cox, 1995); (Liles *et al.*, 1995) y que se requiere de un pequeño incremento en las concentraciones de glucocorticoides, producido por los antígenos, para la formación de las respuestas anticuerpo-específicas (Dhabhar, 1998).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que el hígado tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria, ya que proporciona los componentes necesarios para la defensa del huésped en el sitio de la inflamación y coordina la activación de las proteínas plasmáticas de la fase aguda (Baumann y Gauldie, 1994). Además es el principal órgano de procesamiento del LPS y de otros antígenos provenientes de la comida (Freudenberg y Galanos, 1990) y contiene el mayor depósito de macrófagos en el cuerpo (células de Kupffer).

Existe evidencia que apoya las numerosas interacciones entre el SNC y el hígado (Thayer y Sternberg, 2010). La posibilidad de que tanto el hígado como el cerebro logren detectar la presencia de LPS, sugiere que la comunicación entre el hígado y el cerebro tiene como objetivo difundir el peligro de la infección hacia el cerebro para aumentar o disminuir la respuesta inflamatoria del hígado dependiendo del estado del individuo.

Estudios previos demuestran que la denervación (pérdida de la inervación del órgano, por medio de un procedimiento quirúrgico) subdiafragmática (pérdida de la inervación de toda la cavidad visceral) tiene un efecto inhibitorio ante los síntomas

del “sickness behavior” (Bluthe *et al.*, 1994; Bret-Dibat *et al.*, 1995, Watkins *et al.*, 1994; Tracey, 2002). Sin embargo, en estos trabajos se administraron dosis altas de LPS y la denervación no es específica para el hígado o bien la innervación simpática del hígado se mantuvo intacta; por lo que ésta rama del SNA aún fue capaz de modular la respuesta inmune.

Con base en la literatura actual no se pueden establecer conclusiones definitivas sobre el papel que juega el Sistema Nervioso en la modulación de respuesta inmune, ya que los datos son controversiales y difíciles de interpretar (Hansen *et al.*, 2001). Una razón por la cual hay diferencias en los hallazgos cuando se administra el LPS a roedores vagotomizados (con ablación del nervio vago), puede deberse a las diferencias en los métodos experimentales utilizados, así como en las dosis de LPS, su vía de administración (i.v., i.p., ó s.c.) y el tipo de denervación utilizada (denervación simpática, parasimpática o completa).

En el presente trabajo, se pretende investigar el mecanismo de inflamación dado por la comunicación entre el Sistema Nervioso y el hígado cuando se eliminan las principales vías de comunicación autonómica hacia el cerebro; la vía parasimpática y la simpática. La denervación hepática que se utilizó en este trabajo comprendió la ablación de las fibras aferentes y eferentes de la rama parasimpática y simpática del SNA.

4. HIPÓTESIS

La denervación completa (simpática y parasimpática) del hígado resultará en un cambio en la respuesta inmune, así como un cambio en el patrón de activación del cerebro; la dirección del cambio, indicará la funcionalidad de esta interacción.

Hipótesis específicas

- Si la denervación del hígado cambia entonces la producción de citocinas ante un reto inmune, entonces el cerebro estará actuando como el modulador de la respuesta inmune.
- Sin la llegada de la información periférica al cerebro a través de la vía neural, la activación neuronal será mayor en los CVO's (componentes importantes de la vía de comunicación humoral) que en el NTS (componente de la vía neural).

5. OBJETIVO

- **General.-** Estudiar el mecanismo de comunicación entre el Sistema inmune y el Sistema Nervioso central, en respuesta a una dosis moderada de LPS en animales denervados hepáticamente.
- **Específicos:**
 - a) Evaluar la producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α en plasma, después del reto de LPS en animales denervados y animales control.
 - b) Investigar la contribución del hígado y el bazo en la producción de Citocinas circulantes por medio de la medición de mRNA de las citocinas pro-inflamatorias, antes y después de la administración del LPS en animales denervados y animales control.

- c) Analizar la activación neural antes y después de la administración de una dosis moderada de LPS, para determinar si los núcleos hipotalámicos (OVLT, NSQ, AP, NTS, DMV) involucrados en la comunicación hígado-cerebro.
- d) Evaluar los niveles de glucosa circulante en animales denervados para determinar el papel del hígado como principal órgano metabólico involucrado en el procesamiento de LPS.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. ANIMALES

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 200 a 250 gramos, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones constantes Luz/ Oscuridad (L/D) 12:12, con alimento y agua *ad libitum*; alojadas en cajas individuales de polipropileno de (45 x 30 x 35 cm³). Las luces se encendieron a las 7:00 am (ZT0) y se apagaron a las 19:00 pm (ZT12). Los animales se dividieron en dos grupos: los animales con denervación simpática y parasimpática a nivel hepático y el grupo control que consistió en animales Sham o “falsos operados”. Los animales fueron denervados quirúrgicamente administrándoles anestésicos en mezcla de Ketamina (40-80 mg/kg) con Xylacina (5-8 mg/kg). Se dejaron 3 semanas en recuperación.

6.2. DENERVACIÓN HEPÁTICA(SIMPÁTICA, PARASIMPÁTICA)

Denervación simpática (hígado)

Se realizó una laparotomía. Los lóbulos hepáticos fueron gentilmente acomodados anterior dorsal, los ligamentos que rodean el hígado fueron cortados para liberar el ducto biliar y el complejo de la vena porta, los cuales se aislaron el uno del otro. Al nivel de la vena porta hepática, la arteria hepática se separó en la arteria hepática

propia y la arteria gastroduodenal. Esta división ocurre en la superficie ventral de la vena porta. En este punto, las arterias se separan por una disección de la vena porta. Los nervios que corren a lo largo de la propia arteria hepática fueron removidos usando instrumentos de microcirugía bajo un microscopio (25X de magnificación). Se removió el tejido conectivo que se encontró entre la arteria hepática y la vena porta, eliminando cualquier posibilidad de cruce de nervios.

Denervación parasimpática (hígado)

Se realizó una laparotomía. La cara que contiene la rama hepática se puso a la vista por el movimiento gentil de estomago y esófago. La rama hepática fue separada de la parte izquierda del nervio vago. Se tomó particular cuidado para no dañar la parte dorsal y ventral del nervio vago que inerva el estomago y el tejido abdominal así como los vasos sanguíneos que corren a través de las ramas vagales hepáticas figura 4.

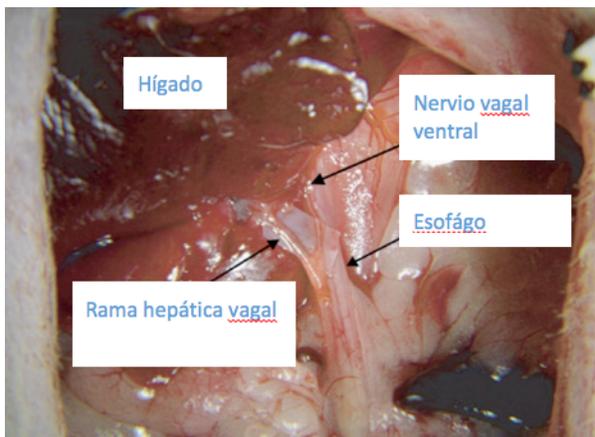


Figura 4. Fotografía donde se ubican el nervio vago. Denervación parasimpática.

Sham o “Falsos Operados”

Se realizó una laparotomía. Y se repitió los procesos anteriormente mencionados (denervación simpática y parasimpática), con la excepción de que no hubo corte alguno de nervios y tejido conectivo.

6.3. INSERCIÓN DE CÁNULA INTRA-YUGULAR.

Después de tres semanas de recuperación del procedimiento quirúrgico anteriormente descrito y bajo las mismas condiciones anestésicas, se insertó un catéter en la vena yugular interna (tubo de silicón y polietileno- 0.025in i.d; Silastic Laboratoy Tubing; Dow Corning Corp; Midland, MI, USA) por el cual se administró el LPS y se tomaron muestras sanguíneas. Las muestras sanguíneas fueron colectadas en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 7000 rpm, durante 7 min. El suero se almacenó en alícuotas de 100 µl a -20°C hasta su uso. Las alícuotas fueron procesadas con un método colorimétrico ELISA para la determinación de IL-6 y TNF α (Invitrogen; Quantikine R&D systems).

6.4. RETO INMUNOLÓGICO

Las ratas fueron inmunizadas con una inyección vía intravenosa de LPS a una dosis de 1.6 µg/kg (extraído de *Escherichia coli*, 90H4012; Sigma-Aldrich Canada, Ltd., Oakville, Ontario, Canada) disuelto en una solución de salina estéril. La solución para la inyección se preparó a partir de una solución *stock* (1 mg LPS in 1ml salina) justo antes del experimento. Todas las inyecciones fueron a las 9am. Las ratas de los grupos control fueron inyectadas con solución salina estéril (Cloruro de Sodio al 0.9%) libre de endotoxinas (1ml/kg) en el mismo punto temporal.

A los 90 minutos después de la administración de LPS y/o salina, las ratas fueron sacrificadas por medio de una sobredosis de pentobarbital sódico y se colectó tejido (bazo, hígado) que fue almacenado a -80°C inmediatamente para evitar que las enzimas (RNAasas) degraden el RNA del tejido. Este tejido se sometió al proceso de extracción de RNA por medio del método de Trizol (Invitrogen) seguido de este, se hizo el cDNA, para evaluar la expresión de IL-6, TNF α , IL-1 y TLR4 mediante la técnica de PCR.

RT-PCR Semi Cuantitativo

El RNA fue aislado del hígado y del bazo con el método de Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron cantidades iguales del RNA total de por lo menos cuatro ratas por condición, para sintetizar el DNA complementario generado con el kit SuperScript III (Invitrogen), el cual se utiliza para sintetizar tanto cDNA y amplificación por PCR, con específicos primers de genes.

Los genes fueron analizados por PCR semicuantitativo (Q-RT-PCR). Las secuencias de los primers utilizados están enlistadas en la Tabla 1. Todos los datos fueron normalizados con la expresión de GAPDH (gen constitutivo) en cada uno de los tejidos. La cantidad de mRNA fue calculada usando los datos obtenidos del análisis del Quantity One ® v 4.5 Software para Windows con Bio-rad Molecular Imager FX.

Nombre del Gen	Secuencias	Número de Acceso
TLR4	<i>Sense</i> 5' TGTATCGGTGGTCAGTGTGC <i>Antisense</i> 5' CAGCAATGGCTACACCAGGA	NM 019178.1
GAPDH	<i>Sense</i> 5' TGATGGGTGTGAACCACGAG <i>Antisense</i> 5' CATTGAGAGCAATGCCAGCC	NM 017008.4
IL6	<i>Sense</i> 5' TCGGCAAACCTAGTGTGCTA <i>Antisense</i> 5' TGCAAGAAACCATCTGGCTAGG	

IL1Beta	Sense	5´CCAGGATGAGGACCCAAGCA
	Antisense	5´TCCCGACCATTGCTGTTTCC
TNF- ALFA	Sense	5´CTCAAGCCCTGGTATGAGCC
	Antisense	5´CAGGGAACAGTCTGGGAAGC

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

Posteriormente se realizó la perfusión intracardiaca con aproximadamente 200 ml de solución salina al 0.9% y 200 ml de Paraformaldehído al 4%, para la fijación de los tejidos; diluido en amortiguador de Fosfatos 0.1M (PBS; pH7.2). Los cerebros se extrajeron manualmente y se almacenaron en paraformaldehído al 4% para mejorar la fijación del tejido durante 72 hrs; después de este tiempo se cambiaron de solución a sacarosa al 30% para su crioprotección. Para procesar el tejido neural, se cortaron secciones coronales del cerebro con ayuda del criostato a una temperatura de -21°C y un grosor de 35 µm. Se colectaron los cortes y se almacenaron en PBS. Se seleccionaron los cortes y se sometieron a la técnica de inmunohistoquímica para c-Fos.

6.5. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes seleccionados de cerebro correspondientes a OVLT, NSQ, AP, DMV y NTS se incubaron en amortiguador de bloqueo (Fracción V de Albumina Bovina 0.5g, Triton X-100 1ml, PBS 500ml Ph 7.6) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación lenta y toda la noche a 4°C con agitación lenta. Al día siguiente se incubó el tejido en amortiguador de bloqueo con el anticuerpo primario anti c-Fos preparado en conejo (Chemicon) a una dilución de 1:10000. Nuevamente se incubó por una hora a temperatura ambiente con agitación lenta y

toda la noche a 4°C. Después se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con amortiguador de fosfatos 0.1M, y NaCl 0.09% Ph 7.6 (PBS). Al terminar se incubó el tejido en amortiguador de bloqueo con un anticuerpo secundario acoplado a biotina anti conejo (Jackson immunoresearch), a una dilución de 1:400, durante una hora a temperatura ambiente con agitación lenta. Se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron con el complejo ABC (Vector) a una dilución de 1:500 en amortiguador de bloqueo por una hora más a temperatura ambiente con agitación lenta, por último se lavaron nuevamente con PBS y se reveló el color con 3-3 diaminobenzidina (Sigma) (DAB) (0.5 mg/ml, en TBS pH 7.2, peróxido de hidrógeno al 30% (15µl) y sulfato de amonio y Níquel al 10% (500µl por cada 50ml de solución de DAB). Cuando se consideró adecuado (una saturación no excedente del color revelado), se detuvo la reacción por medio de dos lavados con PBS y se observó al microscopio, buscando la marca característica de c-Fos. Esta se utilizó para explorar la activación neuronal, ya que la proteína c-Fos presenta una expresión muy rápida a la estimulación de neurotransmisores, de esta manera podemos ver que núcleos se encuentran involucrados en respuesta al reto inmune.

6.6. CUANTIFICACIÓN

Con el fin de cuantificar la inmunoreactividad de c-Fos (Fos IR) se escogieron 3 secciones representativas por núcleo de interés (AP, OVLT, NTS y NSQ) de acuerdo con el atlas estereotáxico de (Paxinos G.,1998), una sección anterior una sección medial y una sección posterior. Las imágenes fueron examinadas bajo un microscopio de luz Nikon Eclipse E600 (Nikon, Tokio; Japón) y capturadas con un ocular de ampliación 20x. Utilizando un sistema de análisis de imágenes computarizado (Image- Pro, Plus. 5.1, Media Cybernetics, Bethesda, MD), las células inmunoreactivas positivas fueron contadas bilateralmente usando un sistema de análisis de imagen computarizado (Image J, 1.42q, National Institutes of Health Bethesda, MD).

La densidad óptica del fondo fue establecida en una región próxima que no presentaba c-Fos. Las células teñidas que alcanzaron o superaron 2 veces la densidad óptica del fondo fueron consideradas positivas y fueron incluidas, mientras que las células bajo este umbral de tinción fueron descartadas. Las células positivas totales se determinaron bilateralmente en cada corte y los valores totales por individuo se promediaron por grupo.

6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la expresión diferencial de c-Fos entre animales denervados y animales Sham, se realizó un Análisis de varianza de dos vías. El análisis post Hoc fue realizado con la prueba Tukey. El nivel de significancia establecido fue $p < 0.05$.

De igual manera para evaluar la varianza entre la cantidad de citocinas plasmáticas entre cada grupo experimental, se realizó un Análisis de varianza de dos vías (ANOVA, medidas repetidas). El análisis post Hoc fue realizado con la prueba Tukey. El nivel de significancia fue establecido de $p < 0.05$.

Para determinar la diferencia de expresión TLR4 entre grupos, se realizó una prueba de T de student. El nivel de significancia establecido fue $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. La denervación hepática completa ocasiona la producción exacerbada de IL-6 y TNF- α después de un reto con LPS.

Para evaluar la respuesta inflamatoria, se midió la cantidad de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 en plasma, antes y después de un reto con 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS, dos horas después del inicio de la luz. Como se muestra en la figura 5, los animales C.D. responden con niveles más elevados de TNF- α a los 40 y 80 minutos después de la administración del reto inmune en comparación con los animales sin denervación (Sham) ($p < 0.001$). Los grupos inyectados con solución salina produjeron niveles muy bajos de TNF- α .

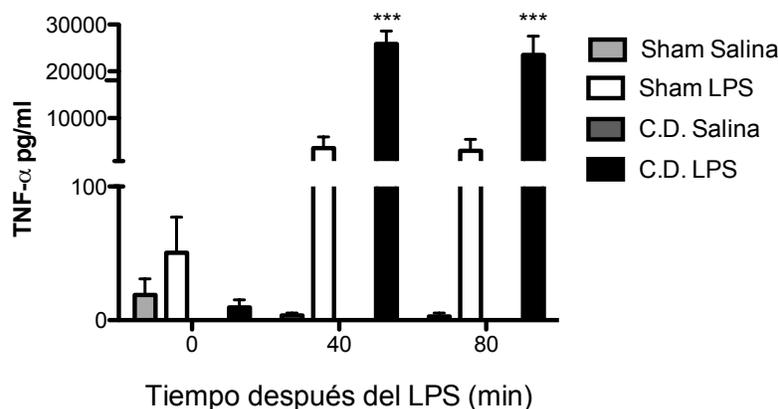


Figura 5. Los animales C.D. producen niveles más elevados de TNF- α en respuesta a un reto con LPS (1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) Nivel de Significancia *** $p < 0.001$ (C.D, LPS comparados con Sham LPS). Los valores se expresan como el promedio \pm E.E. (n=5 ratas por tratamiento). Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías (medidas repetidas). Análisis de varianza. El análisis post Hoc fue realizado con la prueba Tukey. El nivel de significancia establecido fue $p < 0.05$.

De la misma manera se evaluaron los niveles de IL-6 en plasma en respuesta a LPS; como se muestra en la figura 6, la producción de IL-6 se puede observar a partir de los 40 minutos después de la administración del LPS; sin embargo, a este tiempo no se observaron diferencias significativas entre la producción de IL-6 entre C.D. y Shams. El pico de producción de IL-6 se observa a los 80 minutos después del reto inmune, siendo éste punto en donde los niveles de IL-6 en C.D., fueron significativamente más altos en comparación con los niveles de IL-6 en animales Sham, ($p < 0.001$). La administración de solución salina no indujo la producción de IL-6.

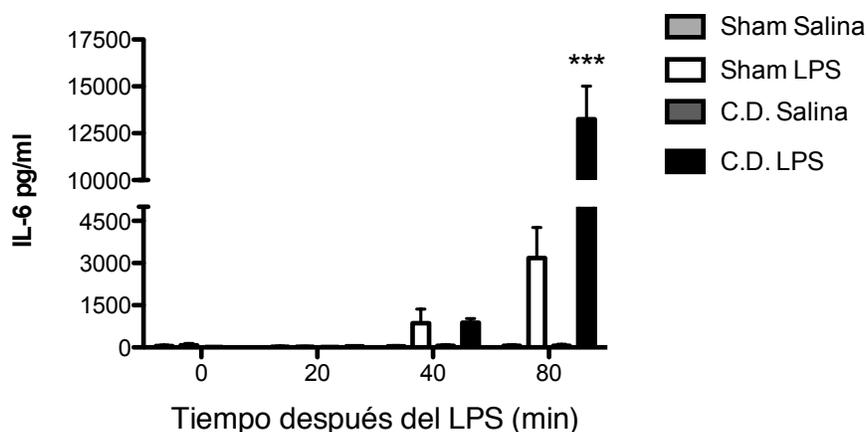


Figura 6. Los animales C.D. producen altos niveles de IL-6 después de un reto i.v., con 1.6µg/kg de LPS en comparación con animales Sham. Nivel de Significancia *** $p < 0.001$ (C.D, LPS comparados con Sham LPS). Los valores se expresan como el promedio \pm E.E. (n=5 ratas por tratamiento). Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías (medidas repetidas). El análisis post Hoc fue realizado con la prueba Tukey. El nivel de significancia establecido fue $p < 0.05$

7.2.1 La denervación hepática completa no modifica los niveles de expresión de genes inflamatorios en el hígado en condiciones basales

Para estudiar los efectos de la denervación hepática en la expresión de los genes inflamatorios en condiciones basales (sin un reto inmune); se evaluó la expresión

de IL-6, IL-1 β y TNF- α después de la administración de solución fisiológica (salina) como control. Como se muestra en la figura 7, los niveles de expresión de las citocinas analizadas, no se modificaron en animales C.D., en comparación con animales sham.

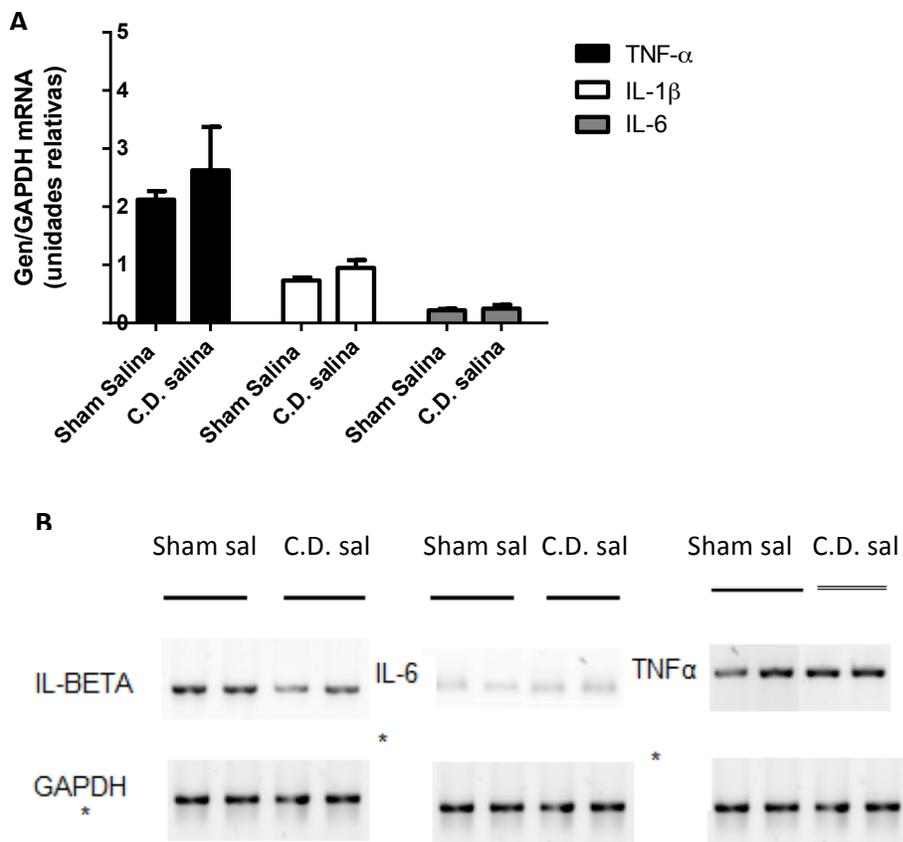


Figura 7. Expresión de genes inflamatorios (IL-1 β , IL-6, TNF- α) en el hígado de animales (C.D.) y Shams, posterior a la administración de solución de solución salina. i.v. La denervación hepática completa no afecta la expresión de los genes inflamatorios analizados en el hígado. La cuantificación de los genes inflamatorios fue normalizada con la expresión del gen GAPDH. Los valores se expresan como el promedio \pm E.E. (n=5 ratas por tratamiento). (A: cuantificación, B: muestras representativas del experimento). Se realizó un Análisis de varianza. El análisis post Hoc fue realizado con la prueba Tukey. El nivel de significancia establecido fue $p < 0.05$.

7.2.2. La administración de LPS no modifica los niveles de expresión de genes inflamatorios en el hígado de animales denervados

Ya que el hígado coordina la activación de las proteínas plasmáticas de la fase aguda, se analizó la expresión de genes inflamatorios luego de la administración de LPS. Como se muestra en la figura 8, no se observaron diferencias significativas en la expresión de los genes inflamatorios (IL-6, IL-1 β y TNF- α) evaluados en el hígado de los animales denervados (C.D.) en comparación con sus controles (Sham) en respuesta a LPS.

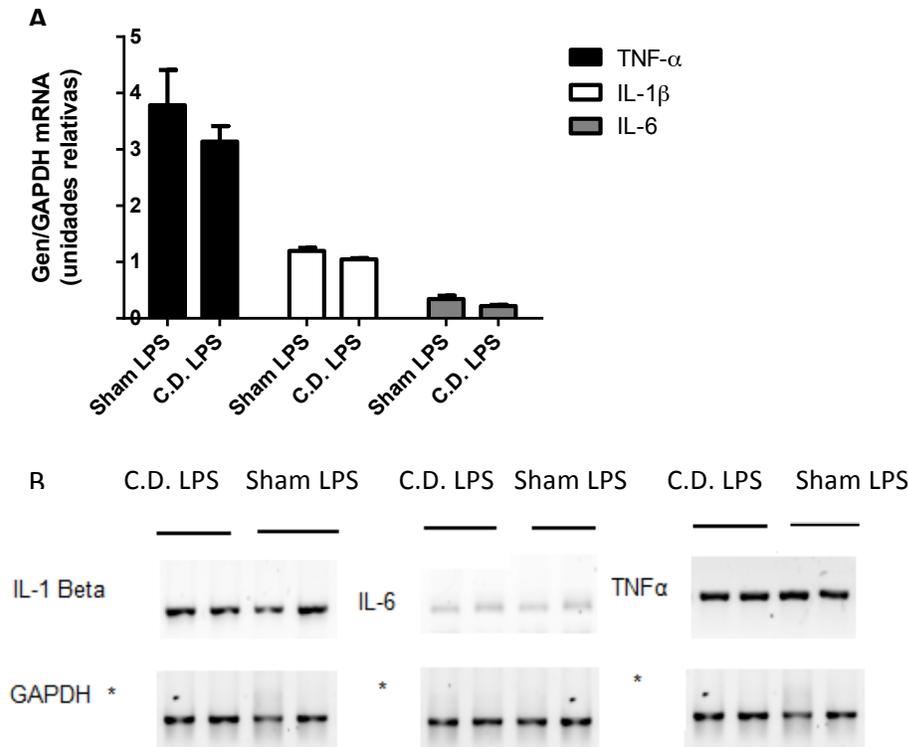


Figura 8. Expresión de genes inflamatorios (IL-1 β , IL-6, TNF- α) en el hígado de animales C.D. y Shams, posterior a la administración de LPS (1.6 μ g/kg, i.v.). La denervación hepática completa no afecta la expresión de genes inflamatorios en el hígado después de un reto con LPS. La cuantificación de los genes inflamatorios fue normalizada con la expresión del gen GAPDH. Los valores se expresan como el promedio \pm E.E. (n=5 ratas por tratamiento). (A: cuantificación, B: muestras representativas del experimento). Se realizó un Análisis de varianza. El análisis post Hoc fue realizado con la prueba Tukey. El nivel de significancia establecido fue $p < 0.05$.

Cuando comparamos la expresión de genes pro-inflamatorios en los C.D. en condiciones basales, contra la administración de LPS, observamos que el LPS no indujo la expresión de estos genes en el hígado (Fig. 9). Por el contrario, observamos que la expresión de TNF- α e IL-1 β en animales Sham aumentó significativamente ($p < 0.05$; $p < 0.001$) en respuesta a la administración de LPS en comparación a sus controles (salina) (Fig. 10). Sin embargo, como mencionamos anteriormente, no se observaron diferencias significativas en la expresión de genes inflamatorios cuando comparamos los efectos de la administración de LPS entre animales C.D., y Sham (Fig. 8). Lo anterior se opone a lo reportado para los niveles de TNF α e IL-6 en el plasma de animales Sham en respuesta a LPS (Fig. 5 y Fig. 6).

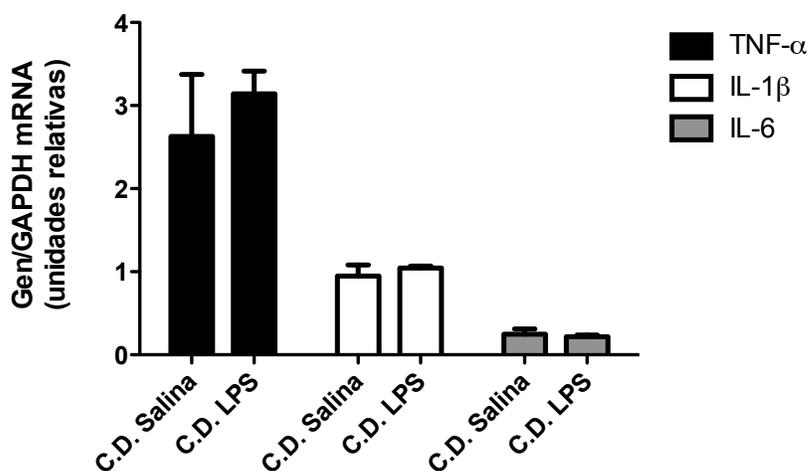


Figura 9. El LPS no afecta la expresión de genes inflamatorios en el hígado de animales C.D. Comparación de la expresión de genes inflamatorios (IL-1, IL-6, TNF- α) en hígados de animales C.D. que recibieron salina contra los que recibieron LPS (1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.). La cuantificación de los genes inflamatorios fue normalizada con la expresión del gen GAPDH. Los valores se expresan como el promedio \pm E.E. ($n=5$ ratas por tratamiento). Se realizó un Análisis de varianza. El análisis post Hoc fue realizado con la prueba Tukey. El nivel de significancia establecido fue $p < 0.05$.

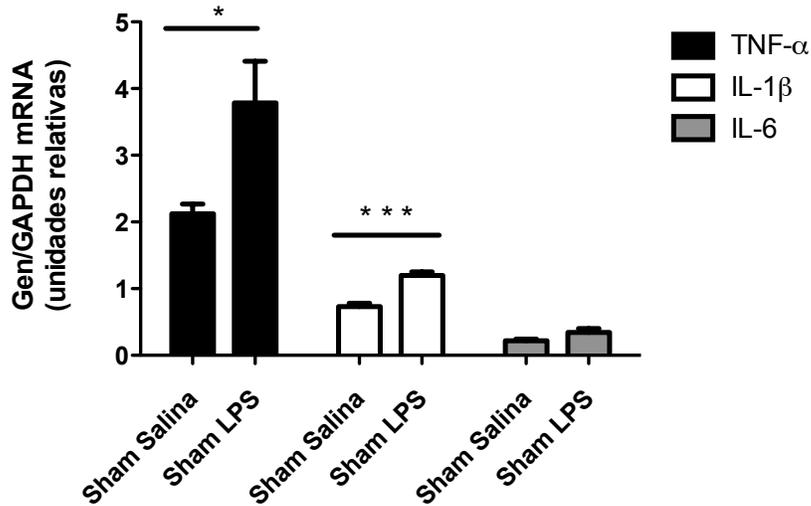


Figura 10. Comparación de la expresión de genes inflamatorios (IL-1 β , IL-6, TNF- α) en hígados de animales Sham que recibieron salina contra los que recibieron LPS (1.6 μ g/kg, i.v.). La administración de LPS induce un incremento en la expresión de los genes TNF- α e IL-1 β . Nivel de Significancia *** p <0.001 (C.D, LPS comparados con C.D., salina), * p <0.05 (C.D, LPS comparados con C.D., salina). La cuantificación de los genes inflamatorios fue normalizada con la expresión del gen GAPDH. Los valores se expresan como el promedio \pm E.E. (n=5 ratas por tratamiento). Se realizó un Análisis de varianza. El análisis post Hoc fue realizado con la prueba Tukey. El nivel de significancia establecido fue p < 0.05.

7.3 Los animales denervados sobre expresan el receptor para el LPS en condiciones basales

Ya que el hígado contiene el mayor depósito de macrófagos en el cuerpo (células de Kupffer) los cuales expresan el receptor tipo Toll específico para el LPS (TLR4), se evaluó la expresión de este receptor en los hígados de los animales Sham y C.D., en condiciones basales (salina). Como se observa en la figura 11, los animales C.D., expresan mayores niveles de TLR4 en comparación con los animales Sham (p <0.05). Además de evaluar la expresión del TLR4 en el hígado, se evaluó su expresión en los bazo de los mismos animales C.D., y Sham, para estudiar el efecto de la cirugía en este órgano con la hipótesis de que la denervación hepática afecta de manera específica dicho órgano. En la figura 12

podemos observar que la expresión del receptor TLR4 no se altera en el bazo después del proceso de denervación hepática.

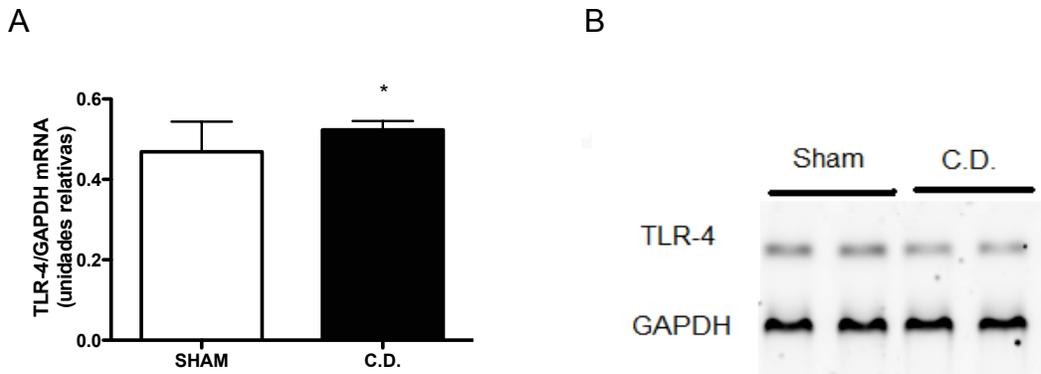


Figura 11. La expresión de TLR4 en el hígado de los animales C.D., aumenta. La expresión de TLR4 en animales Denervados es mayor que en animales Sham después de la inyección de solución salina. Todos los valores están expresados en promedios \pm E.E. (n=4-5 ratas por tratamiento) *P <0.05 (C.D., comparado con sham). La cuantificación del gen TLR4 fue normalizada con la expresión del gen GAPDH. Los valores se expresan como el promedio \pm s.e.m (n=4-5 ratas por tratamiento). (A: cuantificación, B: muestras representativas del experimento). Se realizó una *T de student*, para determinar la varianza. El nivel de significancia establecido fue $p < 0.05$.

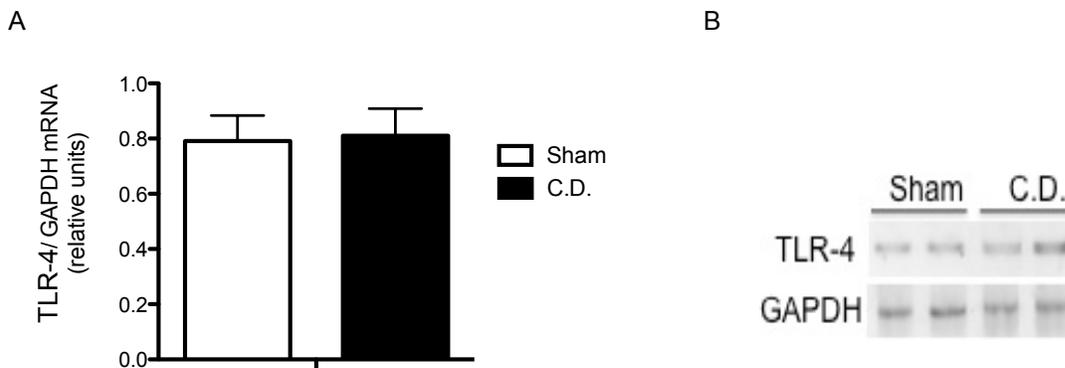


Figura 12. La expresión de TLR4 en bazo de los animales C.D. no se modifica. La denervación hepática no afecta la expresión de TLR4 en animales Sham y Denervados. La cuantificación del gen TLR4 fue normalizada con la expresión del gen GAPDH. Los valores se expresan como el promedio \pm E.E. (n=5 ratas por tratamiento). (A: cuantificación, B: muestras representativas de un

experimento). Se realizó una *T de student*, para determinar la varianza. El nivel de significancia establecido fue $p < 0.05$.

7.4 Los animales denervados sobre expresan el receptor TLR4 en respuesta a un reto con LPS en comparación con los animales Sham

La administración de 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS, induce una mayor expresión del TLR4 en los animales C.D., ($p < 0.05$) en comparación con los animales Sham (Fig. 13). Sin embargo, los niveles de expresión de TLR-4 no se modifican en animales C.D., ni en animales Sham cuando se comparan los efectos de los tratamientos (LPS vs Salina). Lo anterior sugiere que la denervación hepática *per se* provoca un aumento en la expresión del TLR4 en el hígado y que este aumento se mantiene en respuesta a un reto de LPS.

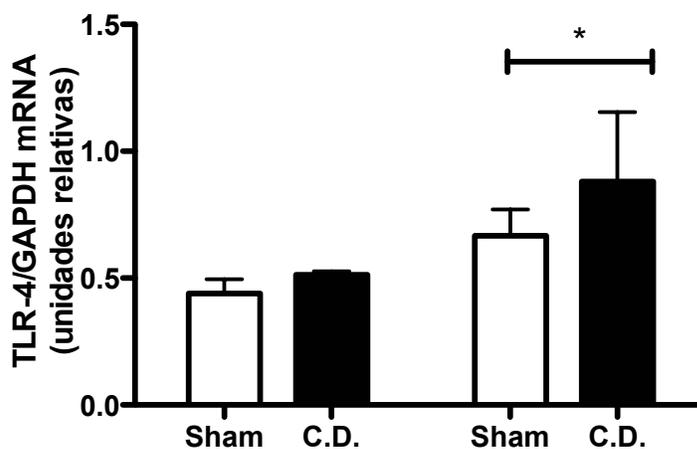


Figura 13. La expresión de TLR4 aumenta en animales C.D., después de la administración LPS en comparación con animales Sham. La cuantificación del gen TLR4 fue normalizada con la expresión del gen GAPDH. Los valores se expresan como el promedio \pm E.E. ($n=5$ ratas por tratamiento).

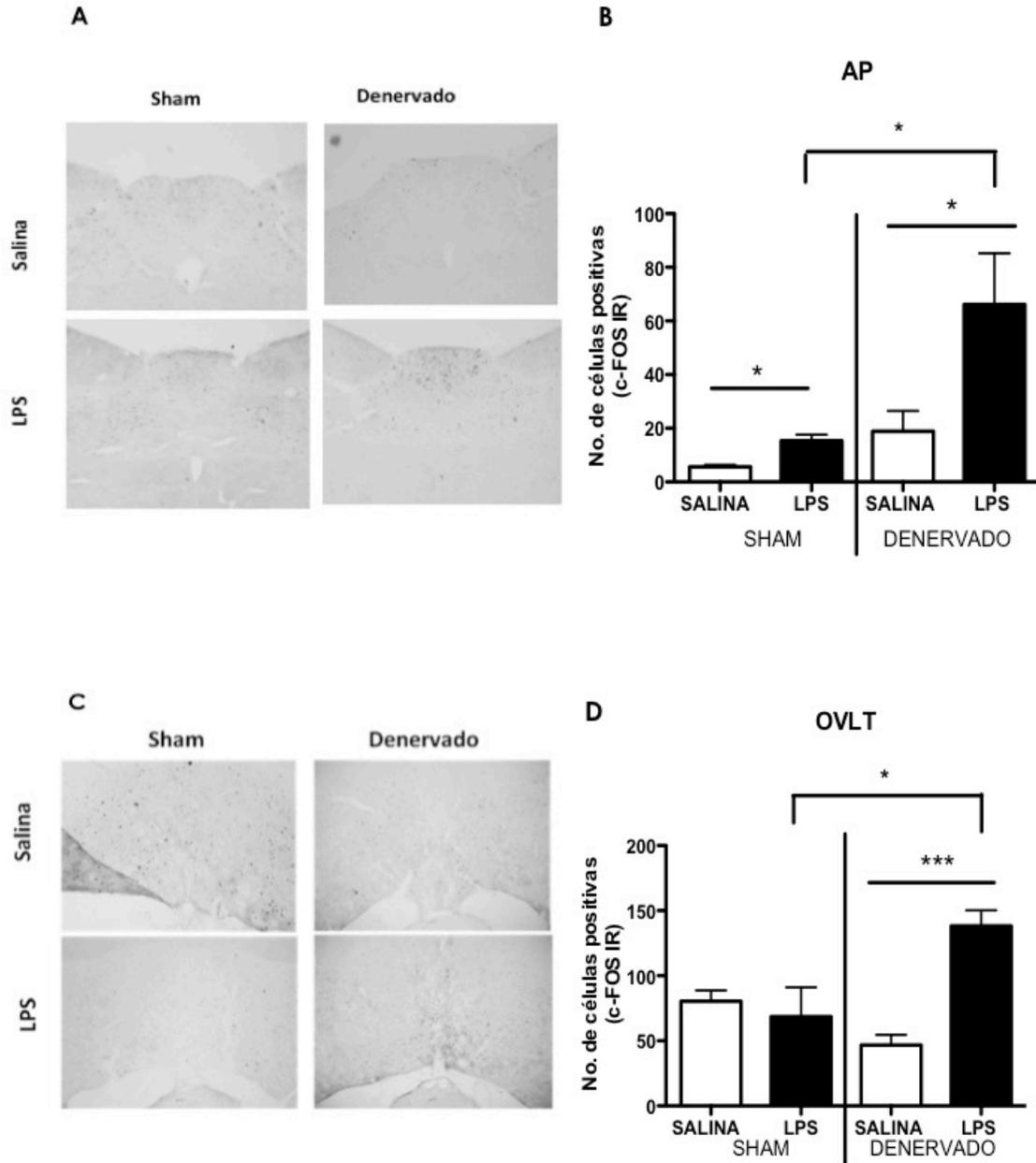
7.4 La denervación hepática completa aumenta la actividad neuronal en los Órganos Circumventriculares (CVO's) en respuesta a LPS

Nuestros resultados muestran que los animales denervados producen altos niveles de citocinas inflamatorias en respuesta a un reto de LPS.

La IL-6 y el TNF- α , pueden ejercer sus efectos en el cerebro a través de la unión a sus receptores específicos presentes en los CVOs (Johnson *et al.*, 2003). A este proceso se le considera como una de las vías de comunicación entre el sistema inmune y el cerebro y se le denomina "vía humoral" (Joly *et al.*, 2007). Por otra parte, el LPS puede unirse directamente a su receptor TLR-4 y activar el cerebro. Este proceso es considerado como parte de la vía humoral.

Como una aproximación para estudiar esta vía de comunicación entre el sistema inmune y el cerebro, se analizó la expresión de c-FOS (marcador de activación neuronal) en el Área Postrema (AP) y el Órgano vasculoso de la lámina terminalis (OVLT), para saber si estos núcleos se encuentran involucrados en respuesta al reto inmune, después de la administración de 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS. Como se muestra en la Figura 14B, la expresión de c-Fos en el AP de animales Sham ($p < 0.05$) y animales C.D. ($p = < 0.05$) aumenta después de la administración de LPS. Sin embargo, cuando se compara la actividad neuronal de los animales C.D., con la de los animales Sham, se observa que el LPS induce mayor activación en el AP de los animales C.D. (Fig.14B; $p < 0.05$).

En el caso del OVLT, como se observa en la figura 14D, la activación neuronal aumenta después de la administración de LPS en los animales C.D. ($p < 0.001$); sin embargo, el OVLT de los animales Sham no presenta un aumento en la activación neuronal después del LPS en comparación con la administración de salina. Cuando comparamos la activación neuronal del OVLT en animales Sham contra C.D., después del LPS (Fig. 14D), observamos que la actividad neuronal en los C.D., aumenta (Fig. 14D; $p < 0.05$). Por otro lado, observamos una disminución en la activación neuronal (Fig. 14D; $p < 0.05$) del OVLT en los animales C.D., después de la administración de solución salina.



Figuras 14. Activación neuronal de los CVO's en animales C.D., y Sham antes y después de un reto con LPS. (A) Fotografías representativas de la actividad neuronal en el Área postrema (AP) de animales C.D., y Sham después de la administración de salina o LPS, (B) Cuantificación de la actividad neuronal en el AP de animales C.D., y Sham después de la administración de salina o LPS.; así como la comparación entre grupos. (C) Fotografías representativas de la actividad neuronal en el Órgano vasculoso de la lámina terminalis (OVLT) en animales C.D., y Sham después de la administración de salina o LPS. (D) Cuantificación de la actividad neuronal en el OVLT en animales C.D., y Sham después de la administración de salina o LPS; así como la comparación entre grupos. El número de células positivas para c-FOS en los diferentes núcleos fue cuantificado bilateralmente en 3 cortes representativos. Los valores se expresan como el promedio

± E.E.(n=5 ratas por tratamiento). Nivel de significancia $p < 0.05$ (Gráfica B LPS vs Salina y, C.D., vs Sham) $p < 0.01$ (Gráfica. D, LPS vs salina y, C.D. vs Sham con $p < 0.001$).

7.5 La denervación hepática aumenta la actividad neural en el NTS en respuesta a la administración de LPS.

La otra vía por la cual la información de la periferia puede llegar al cerebro es la llamada vía neural; las fibras aferentes del vago terminan en el núcleo del tracto solitario (NTS) y en el Núcleo Motor Dorsal del Vago (DMV) (Schwarz, 2012), por esta razón, se analizó la expresión de c-Fos (activación neural) en dichos núcleos.

En la figura 15B, se observa un incremento en la activación neuronal en el NTS de los animales C.D. después de la administración de LPS, ($p < 0.05$); sin embargo, los animales sham no presentan cambios en la actividad neuronal después del mismo reto. Al comparar la activación neuronal del NTS de los animales Sham contra los animales C.D. (Figura 15B), observamos que en éstos últimos se incrementa después de la administración de LPS ($p < 0.05$).

En el caso del DMV, la expresión de c-Fos en animales C.D., aumenta ligeramente después de la administración del LPS (Fig. 15C); no obstante, el aumento no fue significativo. Al comparar la activación neuronal del DMV en animales C.D. contra animales Sham, no se observaron diferencias en la expresión de c-Fos después de la administración de LPS, ni después de la administración de solución salina, sugiriéndonos que la denervación hepática no altera la activación neuronal en este núcleo.

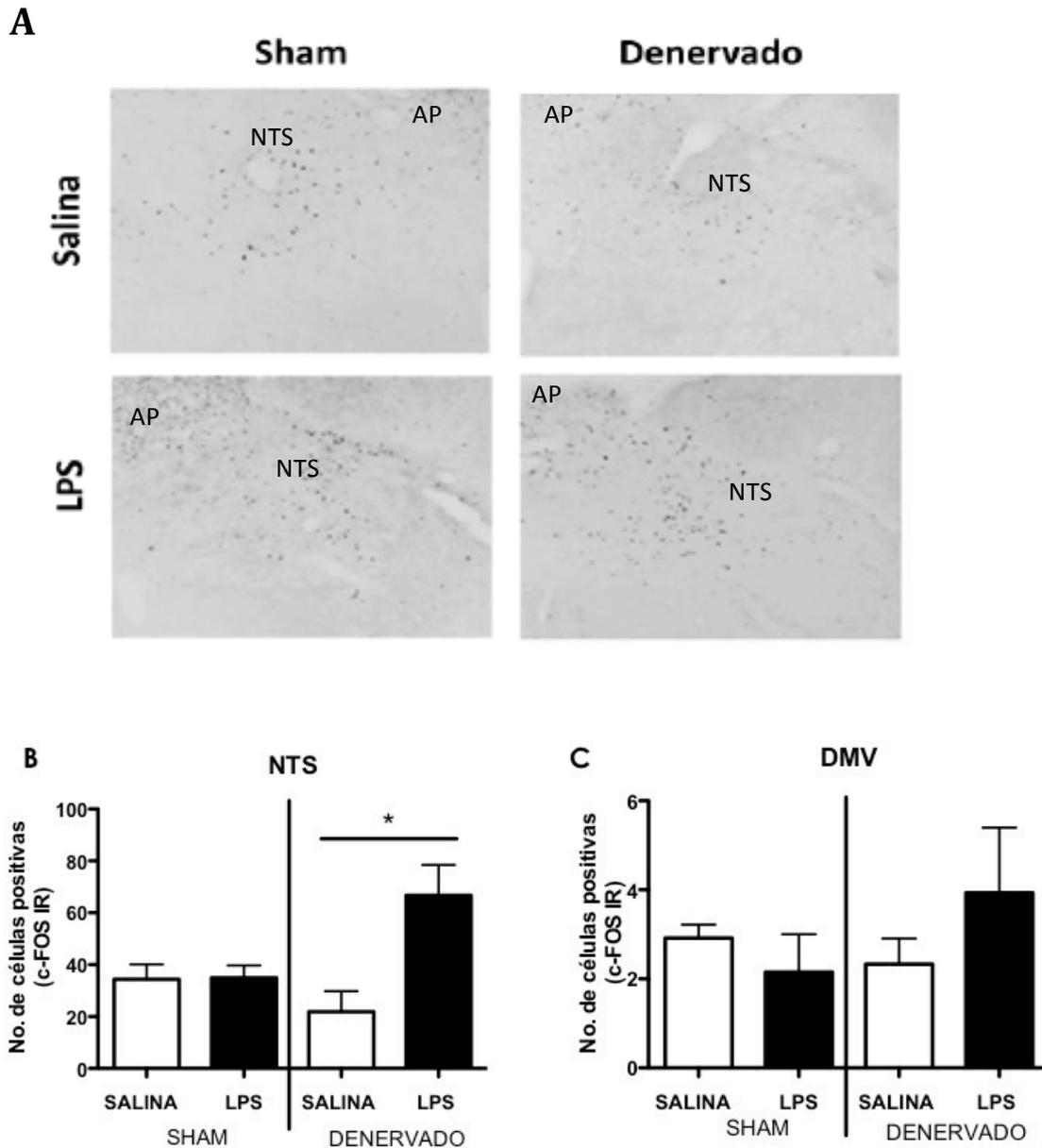


Figura 15. Activación neuronal del Núcleo del tracto solitario (NTS) y Núcleo motor dorsal del vago (DMV) en animales C.D., y Sham después de un reto con LPS o salina. (A) Fotografías representativas de la actividad neuronal en el NTS de animales C.D., y Sham después de la administración de salina o LPS. (B) Cuantificación de la actividad neuronal en el NTS de animales C.D., y Sham después de la administración de salina o LPS; así como la comparación entre grupos (C) Cuantificación de la actividad neuronal del DMV en animales C.D., y Sham después de la administración de salina o LPS; así como la comparación entre grupos. El número de células positivas para c-FOS en los diferentes núcleos fue cuantificado bilateralmente en 3 cortes representativos. Los valores se expresan como el promedio \pm E.E. (n=5 ratas por tratamiento). Nivel de significancia $p < 0.05$ (Gráfica B LPS vs Salina, Gráfica B, C.D., vs Sham)

8. DISCUSIÓN

Comunicación hígado-Cerebro

Nuestros resultados demuestran que en comparación con los animales Sham, los animales con denervación hepática completa, producen altos niveles de IL-6 y de TNF- α después de la administración de LPS (Figs. 5,6). Estudios previos han reportado que las respuestas mediadas por el cerebro ante la administración de retos inmunes periféricos (*Sickness behavior*) se bloquean o atenúan en animales con denervación vagal (Blatteis *et al.*, 1998; Dantzer *et al.*, 1998; Maier *et al.*, 1998; Zielinski *et al.*, 2013). En contraste otros estudios reportan que la vagotomía subdiafragmática no afecta la inducción de fiebre ni la producción de citocinas en plasma (IL-1 β , IL-6) en respuesta a la administración de LPS (Hansen *et al.*, 2000a; Hansen *et al.*, 2000b; Konsman *et al.*, 2000; Wiczorek *et al.*, 2005).

Nuestro estudio, a diferencia de los estudios previamente mencionados, involucra la denervación específica del hígado así como la administración de una dosis baja de LPS por la vía intravenosa, por lo tanto, el aumento de citocinas plasmáticas que se observa luego de la denervación hepática completa en respuesta al LPS, sugiere la contribución de ambas ramas del sistema nervioso autónomo en la contención de la inflamación. En estudios de Tracey (2002) sobre el reflejo anti-inflamatorio, se explica que el aumento de citocinas en plasma es mediado por la falta de unión de la acetilcolina a su receptor en los macrófagos dando lugar a la síntesis de citocinas pro-inflamatorias.

Sin embargo, nuestro estudio involucra de igual manera la denervación de la vía simpática, por lo cual no podemos descartar su contribución en la regulación de la respuesta inflamatoria.

Como mencionamos anteriormente, el SNS regula la respuesta inmune a nivel regional, esta regulación ocurre principalmente por la interacción de la noradrenalina, adrenalina y otras catecolaminas (que funcionan como

neurotransmisores) con las células inmunes, las cuales están equipadas para responder a estas señales adrenérgicas (Fosythe, 2009).

La actividad de estas señales adrenérgicas en el hígado ha sido evaluada *in vitro* (Zeng y Tiau 2009); en este estudio se analizó el efecto de la norepinefrina (NE, neurotransmisor simpático) en la cantidad de citocinas liberadas por las células de Kupffer (macrófagos residentes del hígado) después de un reto con LPS. Sus resultados indican que la NE puede intensificar la respuesta inflamatoria, ya que la cantidad de las citocinas IL-6 y TNF- α , en el medio de las células de Kupffer tratadas con este neurotransmisor aumenta.

Lo anterior indicaría que la rama simpática a través de la NE induce la producción de IL-6 y TNF- α , mientras que la rama parasimpática se encuentra encargada de una regulación inhibitoria en la producción de estas citocinas.

Es importante recalcar, que en el presente trabajo se eliminaron ambas vías autónomas (simpática y parasimpática) del hígado y se observó que después de administrar una dosis baja de LPS se produce una respuesta inflamatoria exacerbada, característica de la administración de dosis altas de LPS, sugiriendo que la eliminación de las conexiones neurales entre el hígado y el cerebro incrementa la sensibilidad al LPS.

Es necesario realizar estudios que involucren denervaciones hepáticas por separado, es decir, sólo simpática o parasimpática, para poder determinar la contribución de cada una de las ramas del SNA en la regulación de la producción de IL-6 y TNF- α después de un reto con LPS.

Estudios previos en nuestro laboratorio, sugieren que la vía de entrada de la información inmune al cerebro, es decir, la vía por la cual el cerebro censa el estado inmunológico del organismo, depende de la dosis del reto inmune administrado. Nosotros hemos observado que después de la administración de 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. de LPS (dosis utilizada en el presente trabajo) a animales intactos, se activan áreas en el cerebro pertenecientes tanto a la vía neural como a la vía humoral. Sin embargo, el presente trabajo involucra la ablación de las conexiones neurales entre el hígado y el cerebro, entonces, ¿Cómo llega la información al

cerebro en los animales C.D.? Nuestros resultados muestran que la administración de LPS induce activación neuronal (c-Fos) en los órganos circumventriculares (CVO's, vía humoral; Fig 14); ya que se observaron altos niveles de IL-6 y TNF- α en la circulación después de la administración del LPS, se propone que esto se debe a que las citocinas circulantes, cruzan la barrera hematoencefálica activando los CVO's. El mecanismo mediante el cual estas citocinas o el mismo LPS podrían estar activando a los CVO's es por medio de su unión a receptores específicos presentes en estas áreas del cerebro (Hansen *et al.*, 2000a; Wuchert *et al.*, 2008).

Por otra parte, la activación de la vía neural en animales C.D., no difiere de la observada en animales Sham, con la excepción del NTS, en donde se observa un aumento en la activación neuronal (c-Fos) en los animales C.D., que recibieron LPS (Fig. 15). Se sabe que el NTS recibe proyecciones neuronales desde el AP (Riverest, 2004). Ya que el AP (Núcleo de la vía humoral) 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 está manteniendo la activación de este último aún en la ausencia de sus conexiones neuronales con el hígado.

El SNA regula la respuesta inmune periférica.

Debido a que se observó un aumento en la concentración de citocinas plasmáticas (TNF- α e IL-6) después de la administración de LPS en los animales C.D., esperábamos observar una relación de éste aumento con la expresión de sus genes en el hígado, que como ya mencionamos anteriormente, es el principal órgano encargado del procesamiento del LPS y contiene el mayor depósito de macrófagos en el cuerpo (Mathison y Ulevitch, 1979) (Freudenberg y Galanos, 1990); sin embargo, la evaluación de la expresión de genes inflamatorios (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) en el hígado, no mostró diferencias en la expresión de estos genes

entre animales C.D., y animales Sham en ninguno de los tratamientos (Salina, LPS; Figs. 7,8,9).

En un estudio de (Tsuji *et al.*, 2010) en el cual se evaluó la expresión de los genes IL-1 y TNF- α en el hígado de ratones sensorialmente denervados después de la administración de LPS, se observó que la denervación sensorial no afectaba la expresión de genes inflamatorios en comparación con los animales no denervados que también recibieron LPS. Sin embargo, en este estudio no se observaron diferencias entre las concentraciones plasmáticas de citocinas en respuesta a LPS entre animales denervados y no denervados.

Lo anterior sugiere que en nuestro estudio otro órgano inmune además del hígado podría ser el encargado de la síntesis de las citocinas que son liberadas a la circulación.

De acuerdo con lo anterior, (Nakamura *et al.*, 2000) evaluaron la expresión de genes inflamatorios en el bazo y el timo observando que la administración de un agonista del receptor β -adrenérgico administrado i.p., inhibía la expresión del mRNA de TNF- α así como de IL-6 en respuesta al LPS, indicando que la ablación de estos receptores podría estar aumentando la expresión de genes inflamatorios en bazo y en timo. Por otro lado, (Karimi *et al.*, 2010) demostraron que la vagotomía subdiafragmática induce un aumento en la proliferación de las células T CD4⁺ del bazo y una mayor sensibilidad (mayor producción de citocinas pro-inflamatorias) ante un estímulo inflamatorio *in vitro*.

No obstante, en el presente estudio, no se realizaron las mediciones de genes inflamatorios en dichos órganos por lo cual no se puede descartar su contribución a los elevados niveles de citocinas plasmáticas que se observan en animales C.D. después de la administración de LPS.

Es importante mencionar que la relación mensajero-proteína no se puede obtener con exactitud con nuestros análisis ya que la medición de la expresión génica fue al momento del sacrificio (80 min, después del LPS) y nuestra medición de los niveles de proteína en plasma (TNF- α e IL-6) fueron de igual manera a los 80 min, por lo cual pensamos que no fue posible observar la expresión de los genes

inflamatorios correspondientes a las altas concentraciones de citocinas plasmáticas; de esta manera, sugerimos evaluar la expresión de mRNA a los 40 min., después de la administración del LPS.

Por otro lado, cuando comparamos la expresión de genes inflamatorios (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) en el hígado de animales Sham en condiciones basales (administración de salina) y en condiciones inflamatorias (LPS), observamos que el LPS induce un aumento en la expresión de estos genes en el hígado (Fig. 10). Por el contrario, en los animales C.D., el LPS no induce un aumento en la expresión de genes inflamatorios en el hígado, sugiriendo que el proceso de transcripción de estos genes en el hígado después de la administración de un reto con LPS podría estar regulado por el cerebro. No obstante, los niveles de citocinas plasmáticas después de la administración de LPS en animales Sham son menores sugiriendo que en la respuesta inmune aguda, el cerebro se encarga de regular a la baja el proceso inflamatorio.

Como una aproximación para evaluar la especificidad del proceso quirúrgico de la denervación hepática, se evaluó la expresión del gen TLR4 (receptor para el LPS) en el bazo de los animales C.D. Nuestros resultados indican que la denervación hepática, en condiciones basales, sólo afecta al hígado, ya que la expresión del receptor para el LPS (TLR4) en el bazo de los animales C.D., no se alteró (Fig. 12). Por el contrario, se observó un ligero aumento en los niveles de expresión del gen TLR4, en el hígado de los animales denervados en condiciones basales (Fig. 11), lo cual indica que el hígado de estos animales tiene más sitios de unión para el LPS y esto podría estar ocasionando el aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a este estímulo.

El aumento de la expresión de TLR4 en el hígado de los animales C.D., coincide con estudios previos donde se reporta que la rama simpática del SNA tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de este receptor en macrófagos del peritoneo regulando la producción de TNF- α (Quan, 2012). Lo anterior sugiere que al eliminar la señalización simpática, la modulación inhibitoria de los mecanismos

receptores que desatan la respuesta inmune se pierde promoviendo la exacerbada producción de citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, los efectos de la rama parasimpática en la regulación de la expresión del receptor TLR4 han sido menos explorados y nuestro estudio sugiere su contribución en la regulación de la expresión de este receptor ya que nuestros animales carecían de la inervación de ambas ramas del SNA.

Estudios con denervación hepática únicamente parasimpática son necesarios para evaluar el efecto específico de esta rama del SNA en la regulación de la expresión de TLR4.

9. CONCLUSIÓN

Con base en los resultados antes descritos, se sugiere que el SNC y el SI trabajan en conjunto a través del hígado para regular la respuesta inmune. La ablación total de las vías autonómicas que inervan al hígado, sensibilizan al organismo, lo que ocasiona una respuesta exacerbada ante un reto inmunológico moderado.

La contribución específica de cada rama del SNA a este fenómeno, se desconoce, por lo que se proponen estudios con denervaciones hepáticas parasimpáticas ó simpáticas, por separado.

Nuestros resultados demuestran que la comunicación neural cerebro-hígado es muy importante para la regulación de la intensidad de la respuesta inmune.

10. LECTURA CITADA

- Abbas K.A., L.A.H., Pilai S. (2012) *Inmunología celular y molecular*, Editorial Saunders, Cuarta Edición, p.336.
- Baumann, H. y Gauldie, J. (1994) The acute phase response. *Immunology today*, **15**, 74-80.
- Benacerraf, B., Sebastyen, M. y Cooper, N.S. (1959) The clearance of antigen antibody complexes from the blood by the reticuloendothelial system. *J Immunol*, **82**, 131-137.
- Berczi, I., Chow, D.A. y Sabbadini, E.R. (1998) Neuroimmunoregulation and natural immunity. *Domestic animal endocrinology*, **15**, 273-281.
- Berkenbosch, F., van Oers, J., del Rey, A., Tilders, F. y Besedovsky, H. (1987) Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science*, **238**, 524-526.
- Bernardini, R., Mauceri, G. y Chiarenza, A. (1990) Rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion is stimulated by interleukin-1 in an eicosanoid-dependent manner. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, **22 Suppl 3**, 61.
- Berthoud, H.R. y Neuhuber, W.L. (2000) Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci*, **85**, 1-17.
- Beutler, B. y Poltorak, A. (2000) The search for Lps: 1993-1998. *J Endotoxin Res*, **6**, 269-293.
- Blatteis, C.M. (1992) Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. *Progress in brain research*, **91**, 409-412.
- Bluthe, R.M., Walter, V., Parnet, P., Laye, S., Lestage, J., Verrier, D., Poole, S., Stenning, B.E., Kelley, K.W. y Dantzer, R. (1994) Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, **317**, 499-503.
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W. y Tracey, K.J. (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, **405**, 458-462.
- Bret-Dibat, J.L., Bluthe, R.M., Kent, S., Kelley, K.W. y Dantzer, R. (1995) Lipopolysaccharide and interleukin-1 depress food-motivated behavior in mice by a vagal-mediated mechanism. *Brain Behav Immun*, **9**, 242-246.

- Bret-Dibat, J.L., Kent, S., Couraud, J.Y., Creminon, C. y Dantzer, R. (1994) A behaviorally active dose of lipopolysaccharide increases sensory neuropeptides levels in mouse spinal cord. *Neurosci Lett*, **173**, 205-209.
- Cox, G. (1995) Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol*, **154**, 4719-4725.
- Dantzer, R., Bluthé, R.M., Gheusi, G., Cremona, S., Laye, S., Parnet, P. y Kelley, K.W. (1998) Molecular basis of sickness behavior. *Ann N Y Acad Sci*, **856**, 132-138.
- Dhabhar, F.S. (1998) Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. *Ann N Y Acad Sci*, **840**, 359-372.
- Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P. y Vizi, E.S. (2000) The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological reviews*, **52**, 595-638.
- Elmquist, J.K., Scammell, T.E. y Saper, C.B. (1997) Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends in neurosciences*, **20**, 565-570.
- Fauci (1998) *Harrison; Principios de Medicina Interna.*, Editorial McGrawHill, Interamericana de México, 17^{va} Edición.
- Felten, D.L., Felten, S.Y., Bellinger, D.L. y Lorton, D. (1992) Noradrenergic and peptidergic innervation of secondary lymphoid organs: role in experimental rheumatoid arthritis. *European journal of clinical investigation*, **22 Suppl 1**, 37-41.
- Forsythe P., B.J. (2009) Neural regulation of the immune response. *Allergy frontiers: Classification and Pathomechanisms*.
- Freudenberg, M.A. y Galanos, C. (1990) Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. *International reviews of immunology*, **6**, 207-221.
- Goehler, L.E., Gaykema, R.P., Hansen, M.K., Anderson, K., Maier, S.F. y Watkins, L.R. (2000) Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Auton Neurosci*, **85**, 49-59.
- Hansen, M.K., Daniels, S., Goehler, L.E., Gaykema, R.P., Maier, S.F. y Watkins, L.R. (2000) Subdiaphragmatic vagotomy does not block intraperitoneal lipopolysaccharide-induced fever. *Auton Neurosci*, **85**, 83-87.
- Hansen, M.K., O'Connor, K.A., Goehler, L.E., Watkins, L.R. y Maier, S.F. (2001) The contribution of the vagus nerve in interleukin-1beta-induced fever is dependent on dose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **280**, R929-934.

- Janeway, C.A., Jr. y Medzhitov, R. (1999) Lipoproteins take their toll on the host. *Curr Biol*, **9**, R879-882.
- Janeway CA., T.P., Wolport MP., Copra JD. (2003) *Immunobiology: The immune system in health and disease*, Editorial McGrawHill, 7 Edición, New York.
- Johnson, J.D., O'Connor, K.A., Hansen, M.K., Watkins, L.R. y Maier, S.F. (2003) Effects of prior stress on LPS-induced cytokine and sickness responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **284**, R422-432.
- Joly, J.S., Osorio, J., Alunni, A., Auger, H., Kano, S. y Retaux, S. (2007) Windows of the brain: towards a developmental biology of circumventricular and other neurohemal organs. *Semin Cell Dev Biol*, **18**, 512-524.
- Kalsbeek, A., Liu, J., Lei, J., Timmermans, L., Foppen, E., Cailotto, C. y Fliers, E. (2012) Differential involvement of the suprachiasmatic nucleus in lipopolysaccharide-induced plasma glucose and corticosterone responses. *Chronobiol Int*, **29**, 835-849.
- Karimi, K., Bienenstock, J., Wang, L., Forsythe, P. (2010) The vagus nerve modulates CD4+ T cell activity. *Brain Behav Immun*, **24**, 2, 316-23.
- Kin, N.W. y Sanders, V.M. (2006) It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J Leukoc Biol*, **79**, 1093-1104.
- Kohm, A.P., Tang, Y., Sanders, V.M. y Jones, S.B. (2000) Activation of antigen-specific CD4+ Th2 cells and B cells in vivo increases norepinephrine release in the spleen and bone marrow. *J Immunol*, **165**, 725-733.
- Kuby J, K.T., Goldsby RA, Osbourne BA (2007) *Inmunología de Kuby*. McGrawHill, España, p 574.
- Kumar V., H.F. (2008) *Patología humana*, Editorial Elsevier, Séptima Edición, España.
- Liles, W.C., Dale, D.C. y Klebanoff, S.J. (1995) Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood*, **86**, 3181-3188.
- Maier, S.F., Goehler, L.E., Fleshner, M. y Watkins, L.R. (1998) The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. *Ann N Y Acad Sci*, **840**, 289-300.
- Marvel, F.A., Chen, C.C., Badr, N., Gaykema, R.P. y Goehler, L.E. (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.
- Maskin (2007) *Terapia Intensiva*, Editorial Panamericana, Cuarta Edición, Buenos Aires, Argentina.

- Mathison, J.C. y Ulevitch, R.J. (1979) The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol*, **123**, 2133-2143.
- Nakamura, A., Johns, E.J., Imaizumi, A., Yanagawa, Y. y Kohsaka, T. (2000) beta(2)-adrenoceptor agonist suppresses renal tumour necrosis factor and enhances interleukin-6 gene expression induced by endotoxin. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, **15**, 1928-1934.
- Nance, D.M. y Sanders, V.M. (2007) Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun*, **21**, 736-745.
- Panuncio, A.L., De La Pena, S., Gualco, G. y Reissenweber, N. (1999) Adrenergic innervation in reactive human lymph nodes. *J Anat*, **194 (Pt 1)**, 143-146.
- Paxinos, G., y Watson C., (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates, *Editorial Elsevier*, Séptima Edición.
- Quan Du, S.M., Li-Yong Chen, Yong-Da Ma, Xiao-Li Guo, Zhen Wang, Zheng-Guo Wang (2012) Major stress hormones suppress the response of macrophages through down-regulation of TLR2 and TLR4. *Journal of Surgical Research*, **173**, 354-361.
- Raetzsch, C.F., Brooks, N.L., Alderman, J.M., Moore, K.S., Hosick, P.A., Klebanov, S., Akira, S., Bear, J.E., Baldwin, A.S., Mackman, N. y Combs, T.P. (2009) Lipopolysaccharide inhibition of glucose production through the Toll-like receptor-4, myeloid differentiation factor 88, and nuclear factor kappa b pathway. *Hepatology*, **50**, 592-600.
- Rojas, O.E. (2007) *Inmunología (de memoria)*, Editorial Panamericana, Cuarta Edición, p, 525,.
- Romanovsky, A.A. (2000) Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: lessons from vagotomy. *Auton Neurosci*, **85**, 39-48.
- Romanovsky, A.A., Simons, C.T., Szekely, M. y Kulchitsky, V.A. (1997) The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation. *The American journal of physiology*, **273**, R407-413.
- Roth, J. y De Souza, G.E. (2001) Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]*, **34**, 301-314.
- Sapolsky, R., Rivier, C., Yamamoto, G., Plotsky, P. y Vale, W. (1987) Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science*, **238**, 522-524.

- Schwarz MJ., B.D.S. (2012) The immune system and the developing brain, Colloquium serie in the developing brain. In science, M.a.C.I. (ed).
- Steinman, L. (2004) Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat Immunol*, **5**, 575-581.
- Sternberg, E.M. (2006) Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol*, **6**, 318-328.
- Sternberg, E.M., Silverman, M.N. y Cizza, G. (2007) The neuroendocrine system and rheumatoid arthritis: insights from anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *The Journal of rheumatology*, **34**, 1443-1445.
- Thayer, J.F. y Sternberg, E.M. (2010) Neural aspects of immunomodulation: focus on the vagus nerve. *Brain Behav Immun*, **24**, 1223-1228.
- Tracey, K.J. (2002) The inflammatory reflex. *Nature*, **420**, 853-859.
- Tsuji, F., Murai, M., Oki, K., Seki, I., Ueda, K., Inoue, H., Nagelkerken, L., Sasano, M. y Aono, H. (2010) Transient receptor potential vanilloid 1 agonists as candidates for anti-inflammatory and immunomodulatory agents. *Eur J Pharmacol*, **627**, 332-339.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C.A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J.H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C.J. y Tracey, K.J. (2003) Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, **421**, 384-388.
- Watkins, L.R., Maier, S.F. y Goehler, L.E. (1995) Cytokine-to-brain communication: a review y analysis of alternative mechanisms. *Life sciences*, **57**, 1011-1026.
- Watkins, L.R., Wiertelak, E.P., Goehler, L.E., Smith, K.P., Martin, D. y Maier, S.F. (1994) Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res*, **654**, 15-26.
- Wrona, D. (2006) Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol*, **172**, 38-58.
- Wuchert, F., Ott, D., Murgott, J., Rafalzik, S., Hitzel, N., Roth, J. y Gerstberger, R. (2008) Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol*, **204**, 66-74.
- Zeng Yi, X.F., Tian F. (2009) Effects of noradrenalin on TNF-alfa and IL-1beta expressions in rat kuppfer cells induced by lps. *Journal of Hepatobiliary surgery*.

