



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**ESTUDIO DE LA RELACIÓN MELATONINA – PÉPTIDOS OPIOIDES EN LA FISIOLÓGÍA  
DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA DE LA RATA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MARCELA VALDÉS TOVAR**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. GLORIA ACACIA BENÍTEZ KING  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DR. FERNANDO GARCÍA TAMAYO  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2015.**



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de noviembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **VALDÉS TOVAR MARCELA** con número de cuenta **98540688** con la tesis titulada **“ESTUDIO DE LA RELACIÓN MELATONINA-PÉPTIDOS OPIOIDES EN LA FISIOLÓGÍA DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA DE LA RATA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. GLORIA ACACIA BENÍTEZ KING:**

Presidente: DRA. ANAHÍ CHAVARRÍA KRAUSER  
Vocal: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ  
Secretario: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES  
Suplente: DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN  
Suplente: DR. RAÚL ANTONIO AGUILAR-ROBLERO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de enero de 2015

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



# **AGRADECIMIENTOS POR EL APOYO RECIBIDO**

Al programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

(Becario No. 48878)

Al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz

(Laboratorio de Neurofarmacología, Subdirección de Investigaciones Clínicas y  
Laboratorio de Análisis Químicos, Dirección de Investigaciones en Neurociencias)

A los miembros de mi Comité Tutor:

Dra. Gloria Acacia Benítez King

Dra. Carolina Escobar Briones

Dr. Fernando García Tamayo

*A mis padres  
por la vida  
y  
a la vida  
por la oportunidad  
de realizar los sueños*

Entre el día y la noche  
hay un territorio inexplorado.  
No es sol ni es sombra:  
es tiempo.

Octavio Paz

# Índice

Lista de abreviaturas .....	i
Resumen .....	1
Abstract.....	3
1. Introducción .....	5
1.1 Influencia de los factores ambientales en la fisiología: el sistema circadiano. ....	5
1.2 La melatonina.....	7
1.3 La respuesta inmune innata y adaptativa.....	11
1.4 Fisiología de los macrófagos .....	15
1.4.1 Los macrófagos del bazo.....	18
1.5 Opioides endógenos derivados de la Proencefalina A (PEA).....	21
1.5.1 Síntesis de encefalinas en células del sistema inmune .....	23
1.5.2 Modulación de la fisiología de los macrófagos y de la respuesta inmune por encefalinas.....	24
2. Planteamiento del problema .....	27
3. Hipótesis.....	28
4. Objetivos .....	28
4.1 Objetivo general .....	28
4.2 Objetivos particulares.....	28
5. Metodología .....	29
5.1 Reactivos .....	29
5.2 Animales.....	29
5.3 Registro de la actividad general .....	29
5.4 Determinación del contenido de Met-Encefalina (MENk) en el bazo durante un periodo de 24 horas .....	30
5.5 Aislamiento y cultivo de esplenocitos mononucleares .....	31
5.6 Inducción <i>in vitro</i> de la respuesta inmune .....	32
5.7 Tinciones por inmunofluorescencia .....	32
5.8 Caracterización del suero anti-MENk-(o).....	33

5.9 Incorporación de <sup>35</sup> S-Metionina e inmunoprecipitación de péptidos que contienen MENk (MENk-containing peptides: MECPs).....	33
5.10 Determinación de proteínas .....	34
5.11 Detección inmunocitoquímica de MECPs.....	34
5.12 Determinación de IL-2 .....	36
5.13 Análisis estadístico.....	36
6. Resultados .....	37
6.1 Registro de la actividad general .....	37
6.2 Determinación del contenido de Met-Encefalina en el bazo durante un periodo de 24 h .	38
6.3 Caracterización de los macrófagos esplénicos en cultivo .....	39
6.4 Síntesis de péptidos que contienen Met-Encefalina (MECPs) en macrófagos esplénicos cultivados.....	40
6.5 Inmunodetección de MECPs en macrófagos esplénicos .....	41
6.6 Evaluación de la respuesta inmune inducida <i>in vitro</i> en esplenocitos mononucleares estimulados con eritrocitos de carnero. ....	43
6.7 Evaluación del contenido de MECPs en macrófagos esplénicos y de la respuesta inmune inducida <i>in vitro</i> tras el restablecimiento del ciclo luz-oscuridad. ....	44
7. Discusión .....	45
8. Conclusiones.....	52
9. Literatura citada .....	53
Apéndice 1 .....	62
Obtención de extractos tisulares de bazo .....	62
Radioinmunoensayo para la determinación de Met-Encefalina (MENk).....	62
Apéndice 2: Artículo requisito .....	69

# Lista de abreviaturas

**AANAT:** Arilalquilamino N-acetiltransferasa

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**BSA:** Albúmina sérica bovina (por sus siglas en inglés: *Bovine Serum Albumin*)

**CD:** Marcador de superficie celular denominado cúmulo de diferenciación (por sus siglas en inglés: *Cluster of Differentiation*)

**CPAs:** Células presentadoras de antígeno

**CTL:** Linfocitos T citotóxicos (por sus siglas en inglés, *Cytotoxic T Lymphocytes*)

**D.O.:** Densidad óptica

**DAB:** Diaminobencidina

**DAMPs:** Patrones moleculares asociados a daño (por sus siglas en inglés, *Damage-Associated Molecular Patterns*)

**DAPI:** 4',6-Diamidino-2-fenilindol

**DCs:** Células dendríticas (por sus siglas en inglés, *Dendritic Cells*)

**E.E.M.:** Error estándar de la media

**ELISA:** Ensayo de inmunoabsorción acoplado a enzimas (por sus siglas en inglés: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**FasL:** Ligando del receptor Fas

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína (por sus siglas en inglés: *Fluorescein IsoTioCyanate*)

**GM-CSF:** Factor de crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos (por sus siglas en inglés, *Granulocyte and Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

**GRC:** Glóbulos rojos de carnero

**BSS:** Solución salina balanceada (por sus siglas en inglés, *Balanced Salt Solution*)



**HIOMT:** Hidroxiindol-O-metiltransferasa

**IFN:** Interferón

**Ig:** Inmunoglobulina

**IL:** Interleucina

**LAN:** Luz en la noche (por sus siglas en inglés, *Light-At-Night*)

**LD:** Luz-oscuridad (por sus siglas en inglés, *Light : Dark*)

**LL:** Luz constante (por sus siglas en inglés, *Light : Light*)

**LPS:** Lipopolisacárido

**M1:** Fenotipo de macrófagos tipo 1

**M2:** Fenotipo de macrófagos tipo 2

**MECPs:** Péptidos que contienen Met-Enkefalina (por sus siglas en inglés, *Met-Enkephalin-Containing Peptides*)

**MEL:** Melatonina

**MEnk-(o):** Sulfóxido de Met-Enkefalina

**MEnk:** Met-Enkefalina

**MERF:** Heptapéptido derivado de la Proencefalina A (extremo carboxilo terminal) con la secuencia Met<sup>5</sup>-Enkefalina-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>

**MERGL:** Octapéptido derivado de la Proencefalina A con la secuencia Met<sup>5</sup>-Enkefalina-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>

**MHC:** Complejo principal de histocompatibilidad (por sus siglas en inglés: *Major Histocompatibility Complex*)

**MMM:** Macrófagos metalofílicos de la zona marginal del bazo (por sus siglas en inglés: *Marginal Metallophilic Macrophages*)

**M<sub>reg</sub>:** Fenotipo de macrófagos reguladores

**MZM:** Macrófagos de la zona marginal del bazo (por sus siglas en inglés: *Marginal Zone Macrophages*).

**NA:** Noradrenalina

**NSQ:** Núcleo supraquiasmático

**OFG:** Factor de crecimiento opioide (por sus siglas en inglés, *Opioid Growth Factor*)

**OFG-R:** Receptor del factor de crecimiento opioide

**PAMPs:** Patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (por sus siglas en inglés, *Patogen-Associated Molecular Patterns*)

**PBS:** Solución salina amortiguadora con fosfatos (por sus siglas en inglés: *Phosphate-Buffered Saline*)

**PEA:** Proencefalina A

**PFA:** Paraformaldehído

**PMA:** Acetato forbol miristato (por sus siglas en inglés, *Phorbol Myristate Acetate*)

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*)

**SNC:** Sistema nervioso central

**TAMs:** Macrófagos asociados a tumores (por sus siglas en inglés, *Tumor-Associated Macrophages*)

**TBS:** Solución salina amortiguadora con Tris (por sus siglas en inglés: *Tris-Buffered Saline*)

**TCR:** Receptor de células T (por sus siglas en inglés, *T-Cell Receptor*)

**TGF:** Factor de crecimiento transformante (por sus siglas en inglés, *Transforming Growth Factor*)

**T<sub>H</sub>:** Linfocitos T cooperadores (por el inglés, *T helper*)

**TLR:** Receptor tipo Toll (por sus siglas en inglés, *Toll-Like Receptor*)

**TMB:** 3,3',5,5'- Tetrametilbencidina

**TNF:** Factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés: *Tumor Necrosis Factor*)

**T<sub>reg</sub>:** Linfocitos T reguladores

**TRITC:** Isotiocianato de tetrametilrodamina (por sus siglas en inglés: *TetramethylRhodamine IsoTioCyanate*)

**VAMP:** Proteína de membrana asociada a vesículas (por sus siglas en inglés: *Vesicle-Associated Membrane Protein*)

**ZT:** Tiempo *Zeitgeber* (por sus siglas: *Zeitgeber Time*)

# Resumen

El ciclo luz-oscuridad es un factor medioambiental que influye sobre la fisiología del sistema inmune, de tal manera que las variaciones en la duración del fotoperiodo alteran la capacidad de respuesta inmunológica. La fisiología de los macrófagos comprende un espectro amplio de funciones que van desde su participación activa en la defensa del hospedero hasta la regulación de la respuesta inmune para su resolución, además de las funciones denominadas homeostáticas como la reparación de tejidos. En particular, los macrófagos desempeñan un papel clave en la transición de la respuesta inmune innata a la adaptativa. La Met-Encefalina ha sido reconocida como un modulador de la fisiología de los macrófagos ya que puede actuar de manera autocrina o paracrina sobre la activación de los macrófagos, su polarización fenotípica y la producción de citocinas, las cuales a su vez favorecen la activación de los linfocitos en las etapas tempranas de la respuesta inmune. Las exigencias de la sociedad moderna han impuesto a la fisiología humana y de los organismos que comparten el entorno, un desafío de adaptación a una condición ambiental diferente a la natural: la exposición a la luz artificial durante la noche. Esto aunado a hábitos de alimentación inadecuados genera la falta de congruencia en la percepción de las señales de tiempo externas, necesarias para sincronizar el sistema circadiano. En consecuencia se produce la cronorruptura, que se ha asociado a diversas enfermedades como la obesidad, el síndrome metabólico, el cáncer y trastornos mentales como la depresión. La prevalencia de estos padecimientos ha ido en aumento y actualmente se consideran problemas de salud pública. Estas afecciones tienen como común denominador un desbalance del sistema inmune, es por ello que el estudio de los mecanismos mediante los cuales la exposición a la luz en la noche puede alterar la capacidad de respuesta inmunológica es relevante. Un modelo experimental que permite estudiar los cambios que produce esta alteración del ciclo luz-oscuridad es la exposición a la luz constante (LL). Previamente se demostró que el contenido tisular esplénico de Met-Encefalina, así como su precursor proteico, la Proencefalina A, están disminuidos en ratas expuestas a esta condición de iluminación. Esto sugiere que la síntesis de encefalinas podría estar alterada. Además, tras un estímulo antigénico, el número de células secretoras de IL-2 e IFN- $\gamma$ , así como el número de células formadoras de anticuerpos fue menor

en el bazo de estos animales, lo que indica un compromiso de la respuesta inmune humoral primaria. Con base en estos antecedentes, en este trabajo se exploró el efecto de la exposición a LL en el ritmo circadiano de actividad general de las ratas así como en el contenido esplénico de Met-Encefalina en un periodo de 24 h. Asimismo, dado que la composición celular del bazo es heterogénea, se obtuvo una población enriquecida en macrófagos esplénicos en los que se exploró si la producción de péptidos que contienen Met-Encefalina (MECPs: *Met-Enkephalin-containing peptides*) es afectada por la exposición de los animales a un régimen de LL. Por último se evaluó la participación de los opioides y sus receptores en la respuesta inmune mediante la estimulación *in vitro* de esplenocitos provenientes de estos animales. Se encontró que 15 días de LL fueron suficientes para perder la ritmicidad circadiana en la actividad general de las ratas. Asimismo, en estos animales el contenido tisular esplénico de Met-Encefalina fue menor y no presentó oscilaciones en un periodo de 24 h, en contraste con los animales expuestos a un ciclo de luz-oscuridad. En concordancia, la síntesis *de novo* de MECPs evaluados mediante la incorporación de <sup>35</sup>S-metionina disminuyó en los macrófagos esplénicos de las ratas expuestas a LL. Además, la detección de MECPs por inmunocitoquímica mostró un decremento en el contenido intracelular de dichos péptidos, así como la ausencia de depósitos granulares en esta condición. Por su parte, la secreción de IL-2 de esplenocitos estimulados *in vitro* con eritrocitos de carnero disminuyó tras la incubación con el antagonista opioide naloxona, lo que sugiere que los péptidos derivados de las células inmunocompetentes y la activación de receptores opioides están involucrados en este proceso. Estos resultados son congruentes con nuestro trabajo previo, en el que se encontró que la respuesta inmune humoral primaria T-dependiente está comprometida desde sus etapas tempranas en los animales expuestos a la LL. En conjunto, los resultados indican que la producción de encefalinas en los macrófagos esplénicos está disminuida en condiciones de luz constante, lo cual podría dar lugar a una interacción sub-óptima entre los macrófagos y los linfocitos en el bazo, con la subsecuente deficiencia en la producción de anticuerpos.

# Abstract

The light-dark cycle is an environmental factor that influences immune physiology, and so, variations of the photoperiod length result in altered immune responsiveness. Macrophage physiology comprises a spectrum of functions that goes from host defense to immune down-regulation, in addition to their homeostatic activities. Macrophages also play a key role in the transition from innate to adaptive immune responses. Met-Enkephalin has been recognized as a modulator of macrophage physiology acting in an autocrine or paracrine way to influence macrophage activation, phenotype polarization, and production of cytokines that would enhance lymphocyte activation at early stages of an immune response. Previously it was shown that splenic Met-Enkephalin tissue content is reduced in rats exposed to constant light. As well, the amount of the protein precursor Proenkephalin A was diminished in the spleen of those animals, which suggests that enkephalin synthesis could be affected under this environmental condition. Moreover, the primary immune response was impaired from its early stages in rats exposed to constant light. In this work we explored the effect of constant light exposure in the general activity rhythm of the rats, as well as in the splenic content of Met-Enkephalin throughout a 24h-period. In addition, since splenic cellular composition is heterogeneous, we cultured splenic macrophages to explore whether production of Met-Enkephalin-containing peptides (MECPs) is affected by exposure of rats to a constant light regime. Finally, we evaluated the primary immune response by *in vitro* stimulation of splenocytes derived from animals subjected to constant illumination. We found that 15 days in constant light was sufficient to disrupt the general activity rhythm of the rats. Splenic Met-Enkephalin content oscillations and levels were also blunted throughout a 24h-period in animals subjected to this environmental condition. In agreement, *de novo* synthesis of MECPs evaluated through incorporation of  $^{35}\text{S}$ -methionine was reduced in CD169<sup>(+)</sup> splenic macrophages from rats exposed to constant light. Moreover, MECPs immunocytochemistry showed a decrease in the intracellular content and lack of granule-like deposits in constant light. Also, IL-2 secretion from antigen-stimulated splenocytes was reduced after incubation with naloxone, suggesting that immune-derived opioid peptides and stimulation of opioid receptors are involved in this

process. Taken together, immune impairment observed at early stages of the response in constant light-subjected rats, could be associated to reduced production of macrophage-derived enkephalins, leading to a sub-optimal interaction between macrophages and lymphocytes in the spleen and the subsequent deficiency in antibody production.

# 1. Introducción

## 1.1 Influencia de los factores ambientales en la fisiología: el sistema circadiano.

Los cambios ambientales cíclicos generados por los movimientos de rotación y traslación de la Tierra han impuesto a los organismos vivos una presión adaptativa a través de la evolución. Esto ha derivado en el desarrollo de un sistema interno de organización temporal que permite sincronizar la fisiología y la conducta con el medio ambiente para optimizar la energía y favorecer las funciones vitales. De esta manera, la mayoría de los procesos biológicos y fisiológicos tienen variaciones periódicas que se conocen como ritmos. A nivel molecular, se ha desarrollado evolutivamente una maquinaria sumamente precisa que consiste en un conjunto de proteínas “reloj”, que actúan como factores de transcripción que se auto-regulan positiva y negativamente mediante asas de retroalimentación para dar lugar a ritmos en la expresión génica (Amaral et al. 2014). Así, los ritmos biológicos se manifiestan en todos los niveles de organización, desde el molecular hasta el organismo completo (Aguilar et al. 2008).

El intervalo promedio en el que se repite una variación rítmica se denomina periodo. Los ritmos endógenos tienen un periodo intrínseco, que se puede ajustar a los ciclos ambientales. Con base en esto, los ritmos circadianos son aquellos cuyo periodo es cercano a las 24 h (*circa*: cerca, *diano*: día). Las variaciones cíclicas de diversos factores ambientales brindan al organismo información acerca del tiempo externo. En particular, el ciclo de iluminación o ciclo luz-oscuridad, es el más constante y predecible de los ciclos ambientales y es uno de los principales sincronizadores (*Zeitgebers*) del sistema temporal endógeno de los organismos (Pittendrigh 1993). De esta manera, la duración del fotoperiodo y la intensidad de la luz pueden indicar al organismo en qué hora del día y en qué estación del año se encuentra.

El sistema circadiano de un organismo complejo se compone de diversos osciladores (células o procesos celulares) que oscilan con un periodo cercano a 24 h, de vías de sincronización (de fase y periodo respecto al ciclo luz-oscuridad), de vías de transmisión o comunicación hacia los sistemas efectores del ritmo y de mecanismos de acoplamiento de los osciladores (Aguilar et al. 2008).

En los mamíferos, la luz es detectada en la retina a través de los fotorreceptores. En particular las células ganglionares que contienen el fotorreceptor melanopsina (Berson et al. 2002), transmiten la información fótica al tracto retino-hipotalámico hasta el núcleo supraquiasmático (NSQ) que constituye el principal reloj circadiano. Éste tiene la función de marcapasos, es decir, que puede imponer su periodo y fase a otros osciladores (Aguilar et al. 2008). Para ello, es necesario transmitir la señal rítmica circadiana al resto del organismo, lo cual puede llevarse a cabo a través de la vía neural mediante las distintas eferencias del NSQ y/o a través de la secreción de melatonina por la glándula pineal, como se describirá más adelante.

Se dice que un ritmo circadiano está sincronizado al ciclo externo de luz-oscuridad cuando se establece una relación de fase estable entre la función cíclica de que se trate y el ciclo de iluminación ambiental (Aguilar et al. 2008). Si los organismos son sometidos a condiciones de luz tenue u oscuridad constantes, los ritmos endógenos persisten pero adoptan su propio periodo, cercano pero no igual a 24 h. Esto se denomina corrimiento libre o libre curso (Aschoff 1981). En algunas condiciones ambientales como la exposición continua a la luz brillante se puede perder la ritmicidad circadiana.

El acceso a la luz eléctrica ha traído a la humanidad innumerables beneficios. Sin embargo, los requerimientos actuales de nuestra sociedad, en la que hay actividad durante las 24 h y los 7 días de la semana, ha generado que la población humana así como los animales que viven en las ciudades y en áreas cercanas, estén expuestos a condiciones no naturales de exposición a la luz. La desincronización interna de los organismos respecto a las señales de tiempo externas genera lo que se conoce como cronorruptura (en inglés *chronodisruption*), y que se ha definido como una perturbación relevante de la organización circádica de la fisiología, de la endocrinología, del metabolismo y de la conducta (Erren and Reiter 2009). La presencia de luz durante la noche (por sus siglas en inglés LAN: *light-at-night*) es uno de los principales generadores de dicha desincronización, que ha sido asociada con una mayor prevalencia de enfermedades como trastornos afectivos (Bedrosian y Nelson 2013; Bedrosian et al. 2013b), desórdenes metabólicos (Escobar et al. 2011; Reiter et al. 2012) y cáncer (Jasser et al. 2006; Reiter et al. 2007). Cinzano y colaboradores (2001) han reportado que en las ciudades industrializadas, más del 90% de la población está expuesta a la contaminación por LAN (Figura 1.1).





**Figura 1.1** Contaminación por luz durante la noche. Se ha estimado que en las ciudades industrializadas el 90% de la población está expuesta a esta condición. Imagen de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) National Geophysical Data Center, EUA.

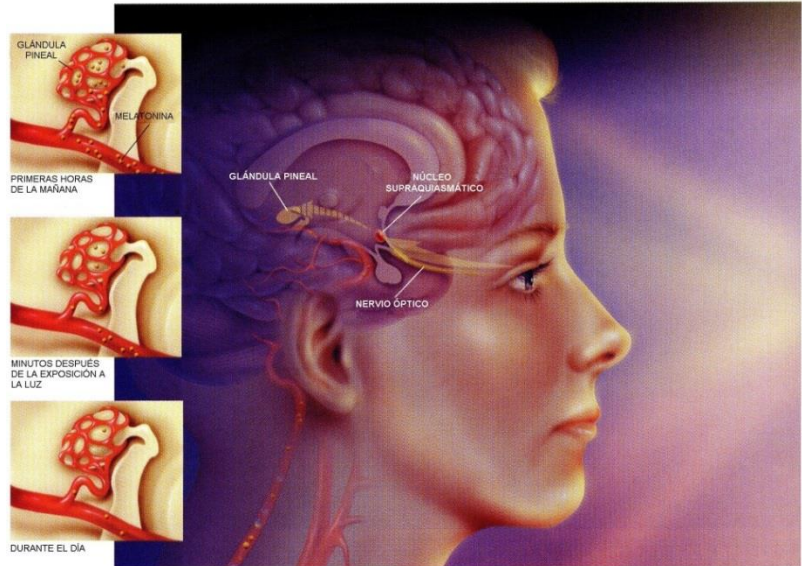
La exposición a la luz constante (LL) se ha utilizado como una estrategia experimental para el estudio de la desorganización circádica. Las evidencias indican que en condiciones de LL incrementa la formación espontánea de tumores y se reduce la esperanza de vida en ratas jóvenes (Vinogradova et al. 2010). Asimismo, esta condición favorece el desarrollo de síndrome metabólico e incrementa la carcinogénesis inducida por sustancias químicas en ratas (Anisimov et al. 2012). Tanto el desarrollo de cáncer como de los desórdenes metabólicos implican un desbalance de las funciones del sistema inmune. En este sentido, Trufakin et al. (2007) reportaron que la exposición a la LL induce en los ratones una condición de desincronización interna que disminuye la capacidad de respuesta inmune así como su resistencia, a nivel molecular, ante un reto con sustancias químicas tóxicas (Shurlygina et al. 2010). También se ha reportado que la contaminación por LAN altera la función del sistema inmune en respuesta al estrés en el hámster (Bedrosian et al. 2013a; Bedrosian et al. 2011).

## 1.2 La melatonina

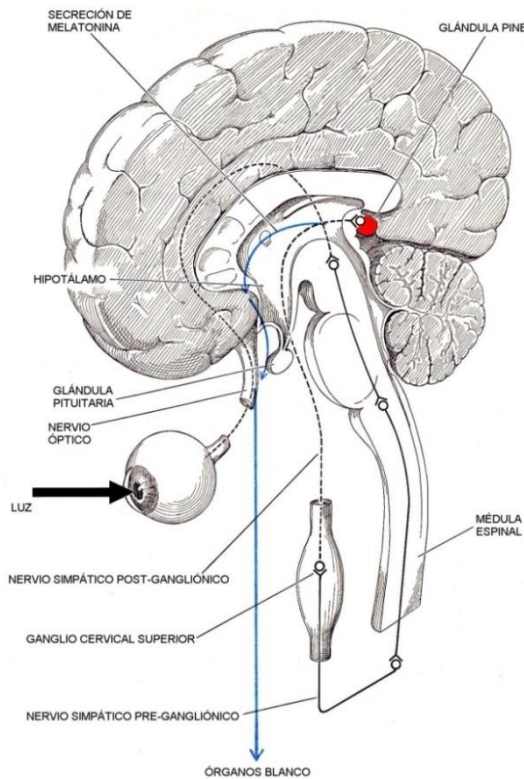
La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es el principal producto de la glándula pineal en los vertebrados. Se aisló por primera vez por Aarón B. Lerner a partir de glándulas pineales de bovino (Lerner et al. 1958).

Como se mencionó anteriormente, uno de los sistemas eferentes del NSQ es la regulación de la síntesis de melatonina de la glándula pineal (Figura 1.2).

El NSQ, ubicado en el hipotálamo anterior, proyecta fibras nerviosas eferentes hacia la médula espinal. Las neuronas de este componente del sistema nervioso central (SNC) inervan el ganglio cervical superior y a partir de éste se proyectan las fibras post-ganglionares simpáticas que inervan la glándula pineal (Figura 1.3). Así, el NSQ transmite el estímulo hacia la pineal para la producción de melatonina cuando empieza la fase de oscuridad (Reiter 1993).



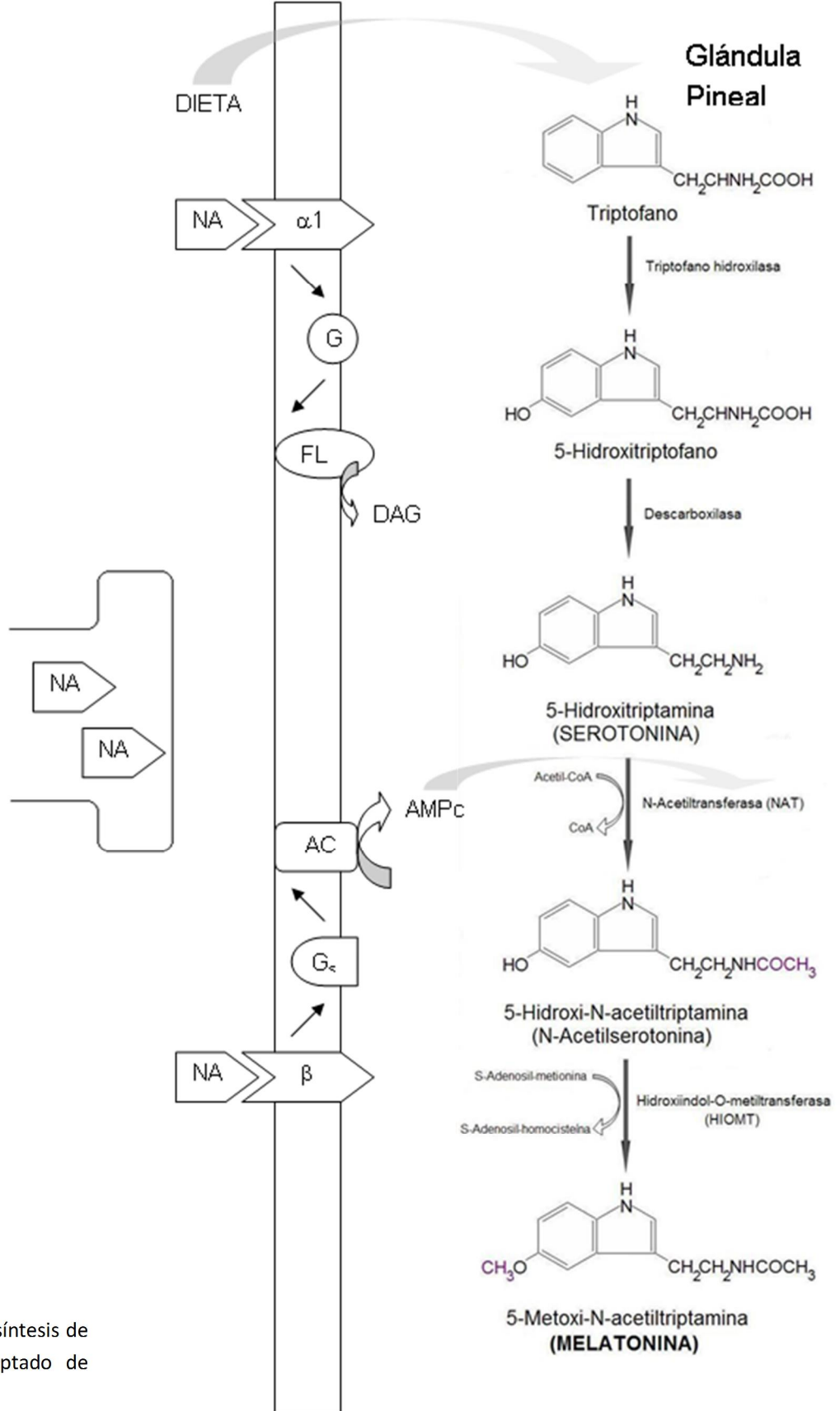
**Figura 1.2** La luz es la señal del medio ambiente que se capta a través de las células ganglionares en la retina. La información fótica se transmite por el nervio óptico hasta el NSQ en el hipotálamo anterior. A partir de este núcleo, se envía la señal a la glándula pineal para inhibir la producción de melatonina [Adaptado de (Young 2000)].



**Figura 1.3** La vía neuronal que sigue la señal de luz captada por la retina incluye el nervio óptico, el núcleo supraquiasmático, la médula espinal, el nervio simpático pre-ganglionar, el ganglio cervical superior, el nervio simpático post-ganglionar y finalmente la glándula pineal [Adaptado de (Wurtman 1975)].

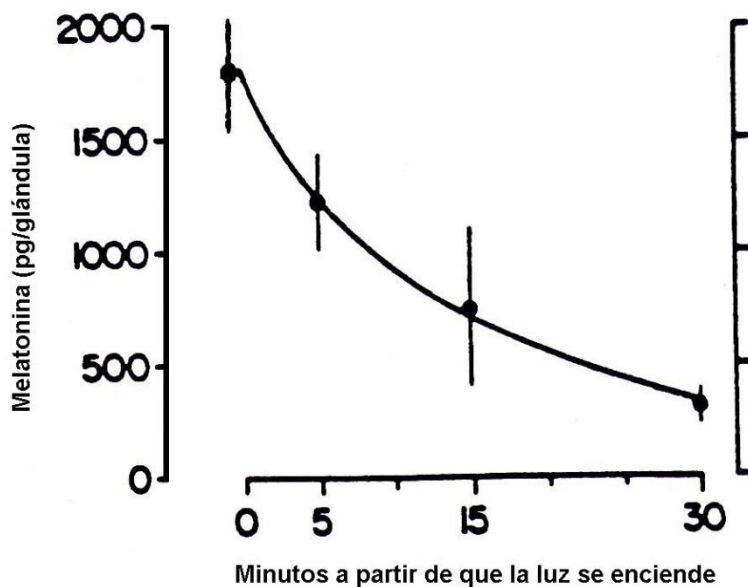
Las terminales post-ganglionares simpáticas que inervan la glándula pineal liberan noradrenalina (NA) (Fig. 1.4). Este neurotransmisor se une tanto a los receptores  $\beta$ - como  $\alpha$ -adrenérgicos en la membrana del pinealocito. La señal adrenérgica induce la síntesis de melatonina al estimular la expresión de la N-acetiltransferasa (AANAT) y al incrementar su actividad enzimática (Gupta et al. 2005). La AANAT actúa sobre la serotonina produciendo N-acetilserotonina. Esta molécula es transformada a melatonina por acción de la hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT).

La unión de NA a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos tiene como consecuencia un incremento en la concentración intracelular de calcio, y se ha sugerido que favorece la respuesta a la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Klein y Berg 1970).



**Figura 1.4** Ruta de síntesis de la melatonina. [Adaptado de (Cardinali 1981)]

En los mamíferos, la actividad enzimática de la AANAT, y en consecuencia la producción y secreción de melatonina presentan un ritmo circádico, en el que los niveles plasmáticos máximos de la hormona se encuentran en la fase de oscuridad, independientemente del patrón de actividad de la especie (Reiter 1993). La exposición a la luz visible es un factor ambiental que inhibe inmediatamente los mecanismos enzimáticos para la producción de melatonina (Figura 1.5). La intensidad y la longitud de onda de la luz requerida para esta inhibición varían según la especie, y es reconocido que los animales de actividad nocturna son más sensibles a estos cambios. Para una revisión ver (Reiter 1993).



**Figura 1.5** La exposición a la luz durante la noche, incluso por el lapso de un segundo, produce una disminución drástica del nivel de melatonina en la glándula pineal de la rata. A los 10 minutos, el contenido de la hormona disminuye en un 50% y a los 20-30 minutos se alcanza la concentración que prevalece durante el día. [Adaptado de (Reiter 1993)]

Como se mencionó previamente, la sociedad moderna está expuesta a la contaminación por luz y este hecho ya se ha asociado al incremento de la prevalencia de algunas enfermedades, entre ellas el cáncer. En este sentido, el grupo de Blask y colaboradores ha demostrado que la supresión de la melatonina nocturna dada por la exposición a la LAN, incluso con una intensidad de luz muy tenue (0.2 lux), está asociada a un incremento en el metabolismo y crecimiento tumorales (Blask et al. 2009), así como en la metástasis (Mao et al. 2012). De manera similar, se ha demostrado que trastornos como la obesidad y el síndrome metabólico pueden estar asociados a la presencia de luz durante la noche debido a la cronorruptura que ésta genera (Fonken et al. 2013a; Reiter et al. 2012).

El desarrollo y progresión del cáncer así como de las enfermedades metabólicas implica un desbalance del sistema inmune. En este sentido se ha demostrado que la melatonina tiene diversas funciones inmunomoduladoras y puede actuar de manera endocrina, paracrina y autocrina sobre las células del sistema inmune (Carrillo-Vico et al. 2013). Entre sus principales funciones, la melatonina modula la producción de citocinas y enzimas pro-inflamatorias, así como otros mediadores de la inflamación como los leucotrienos. Puede también contribuir a la proliferación de los linfocitos y/o modular su apoptosis. Además, por su propiedad de captar radicales libres, contribuye a restaurar el equilibrio redox en los tejidos inflamados (Radogna et al. 2010). La melatonina tiene efectos pro- o anti-inflamatorios según la etapa de la respuesta inmune, es decir, favorece su activación en las fases tempranas y también contribuye a atenuar la respuesta durante la fase de resolución, para evitar la inflamación crónica (Carrillo-Vico et al. 2013).

### **1.3 La respuesta inmune innata y adaptativa**

Se conoce como respuesta inmune al conjunto de procesos que se llevan a cabo de manera concertada y que abarcan desde el reconocimiento de un antígeno hasta su eliminación.

La respuesta inmune innata abarca a las barreras epiteliales que impiden la entrada de microorganismos o partículas exógenas al organismo, así como a los mecanismos efectores de las moléculas solubles y células que reconocen específicamente estos antígenos si logran ingresar a los tejidos subepiteliales o al torrente sanguíneo. El reconocimiento está dirigido a patrones moleculares generales asociados a microorganismos o a daño tisular y que se conocen respectivamente como PAMPs (por sus siglas en inglés: *Patogen-Associated Molecular Patterns*) o DAMPs (*Danger-Associated Molecular Patterns*). Los receptores que llevan a cabo el reconocimiento de los PAMPs y los DAMPs se denominan PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), y están presentes en la membrana plasmática, en las membranas endosomales así como en el citoplasma, de tal manera que pueden reconocer antígenos en diferentes compartimentos celulares (Abbas et al. 2012). Los neutrófilos, los macrófagos y las células dendríticas (DCs: *Dendritic Cells*) expresan el repertorio más amplio de PRRs en el organismo, por lo que tienen un papel clave en la respuesta, como se mencionará más adelante.

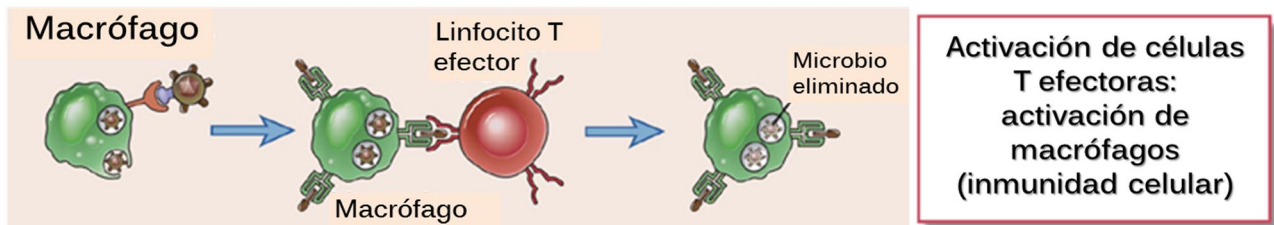
El reconocimiento de antígenos a través de las moléculas solubles presentes en la sangre o en el fluido extracelular favorece su eliminación mediante fagocitosis o por lisis directa del microorganismo, en el caso de la activación de las proteínas del complemento. Además, en este proceso se generan sustancias quimioatrayentes y pro-inflamatorias que favorecen el reclutamiento de leucocitos que reconocen y eliminan al antígeno por fagocitosis o por citotoxicidad. Entre los leucocitos especializados en la fagocitosis se encuentran los neutrófilos, macrófagos y DCs, mientras que las células NK (*Natural Killer*) y los mastocitos tienen actividad citotóxica. Tanto los leucocitos residentes como los reclutados al sitio de la lesión, así como las células epiteliales liberan citocinas, quimiocinas y sustancias vasoactivas que favorecen el proceso inflamatorio.

Las principales funciones de la respuesta inmune innata son la prevención y el control de las infecciones, la eliminación de células dañadas, transformadas o muertas y la estimulación de la respuesta inmune adaptativa (Abbas et al. 2012). Esta última función se logra mediante la participación de las células presentadoras de antígeno (CPAs). Éstas tienen la capacidad de reconocer e internalizar los antígenos, procesarlos bioquímicamente y acoplarlos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC: *Major Histocompatibility Complex*) para externalizarlos y presentarlos a los linfocitos T. Además, las CPAs expresan en su membrana moléculas coestimuladoras y secretan citocinas que en conjunto, inducen la activación de los linfocitos T. Las células que tienen esta capacidad y por lo tanto participan en la transición de la respuesta inmune innata a la adaptativa son las DCs y los macrófagos.

En la respuesta inmune adaptativa el proceso de reconocimiento y eliminación de un antígeno además genera una población de células de memoria, capaces de responder de una manera más rápida y eficiente en el caso de exposiciones subsecuentes al mismo antígeno. La respuesta inmune adaptativa se clasifica como celular o humoral según el tipo de efectores que se generan. En la respuesta inmune celular, se genera una clona específica de linfocitos T efectores que eliminan al antígeno mediante diversos mecanismos que implican una interacción célula-célula. Cuando los linfocitos T efectores son del linaje CD4<sup>(+)</sup> o cooperadores (T<sub>H</sub>: *T helper*), éstos se encargan de reclutar y activar a otros leucocitos especializados en eliminar diferentes tipos de patógenos (Abbas et al. 2012c). Por ejemplo, los linfocitos T<sub>H</sub>1 inducen la activación de los



macrófagos para la eliminación de microorganismos intracelulares (Figura 1.10); los linfocitos  $T_H17$  reclutan y estimulan la actividad de neutrófilos y monocitos para la eliminación de patógenos extracelulares como bacterias y hongos, mientras que los linfocitos  $T_H2$  reclutan y activan eosinófilos y células cebadas para la eliminación de helmintos. Por otra parte, los linfocitos T efectores del linaje  $CD8^{(+)}$  o citotóxicos (CTL: *Cytotoxic T Lymphocytes*) eliminan directamente a las células infectadas mediante la liberación controlada de perforina y granzimas, o bien por la activación del receptor Fas mediante su ligando (FasL). Ambos mecanismos inducen la apoptosis de las células infectadas. Este tipo de respuesta es típica para infecciones de tipo viral o para microorganismos que escapan de los fagosomas hacia el citoplasma celular.

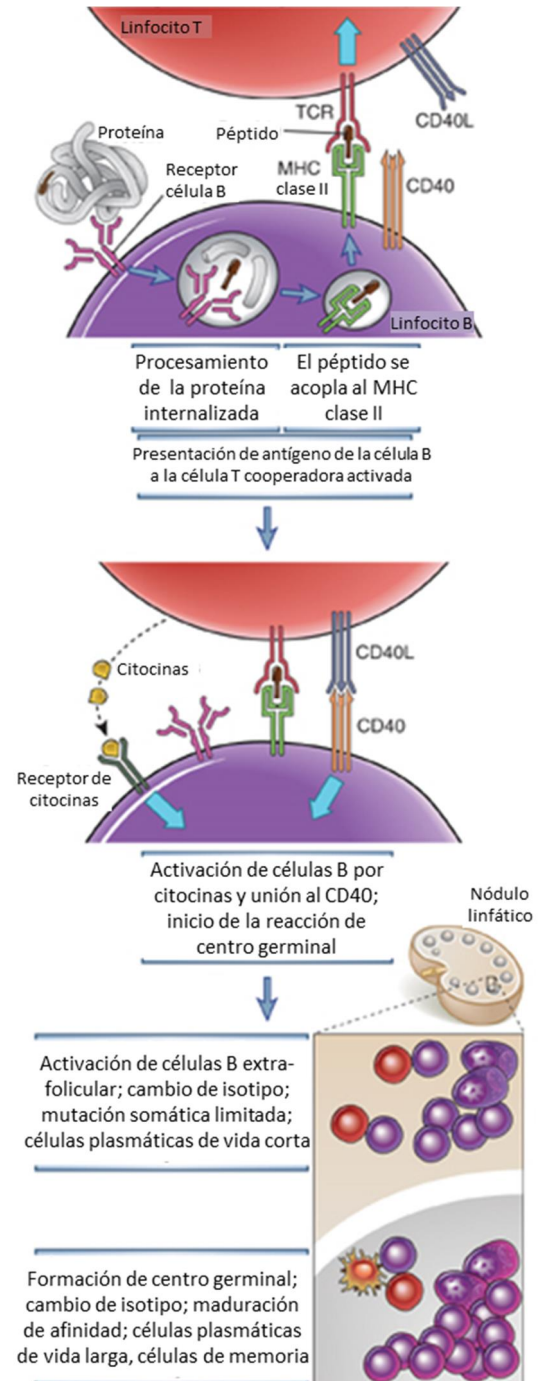


**Figura 1.10** Los macrófagos reconocen antígenos, los fagocitan y los presentan a los linfocitos T efectores activados que a su vez estimulan a los macrófagos para favorecer su actividad microbicida como parte de los mecanismos de inmunidad celular [Adaptado de (Abbas et al. 2012c; Davies et al. 2013)]

Por su parte, en la respuesta inmune humoral se genera una clona específica de linfocitos B, que se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos y linfocitos B de memoria. Los anticuerpos generados son los efectores de la respuesta, por ello se denomina humoral. Esta respuesta está dirigida principalmente a microorganismos extracelulares y toxinas, que pueden ser neutralizados por los anticuerpos para su posterior eliminación. Para antígenos de naturaleza proteica, la respuesta inmune humoral requiere la cooperación de los linfocitos  $T_H$  (Abbas et al. 2012b). En este caso se lleva a cabo una respuesta de tipo T dependiente, que involucra la participación de CPAs que exhiben el antígeno asociado a su MHC clase II. Este complejo es reconocido por el receptor de células T (TCR: *T-cell Receptor*) y esta señal, junto con las moléculas co-estimuladoras, desencadenan la proliferación clonal de linfocitos  $T_H$  específicos para dicho antígeno (Abbas et al. 2012a). Este proceso se lleva a cabo en las zonas de células T en los órganos linfoides secundarios. Asimismo, en los folículos los linfocitos B específicos para

ese antígeno lo internalizan y lo procesan para presentarlo asociado a las moléculas MHC II. Además, los linfocitos B cambian su patrón de receptores de quimiocinas, lo que les permite migrar hacia la zona de linfocitos T. Finalmente, los linfocitos B presentan el antígeno a los linfocitos T<sub>H</sub>, que como su nombre lo dice, cooperan con los linfocitos B para llevar a cabo una respuesta inmune humoral eficiente. Los linfocitos T<sub>H</sub> activan a los linfocitos B mediante la secreción de citocinas y mediante interacciones ligando-receptor a través de moléculas de membrana como CD40L y CD40 (Figura 1.11). La cooperación de los linfocitos T<sub>H</sub> permite que se lleven a cabo procesos que optimizan la respuesta inmune humoral como el cambio de isotipo de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, el proceso de maduración de la afinidad, la generación de linfocitos B de memoria y la diferenciación hacia células plasmáticas de larga vida. Estos procesos se llevan a cabo en los centros germinales formados al interior de los folículos de células B (Abbas et al. 2012b).

Finalmente, cabe mencionar que la respuesta inmune adaptativa se denomina primaria cuando es la primera vez que el organismo entra en contacto con un antígeno, mientras que se denomina secundaria cuando se trata de un encuentro subsecuente con dicho antígeno y ya existen células de memoria capaces de reconocerlo y responder de una manera más rápida y eficiente.



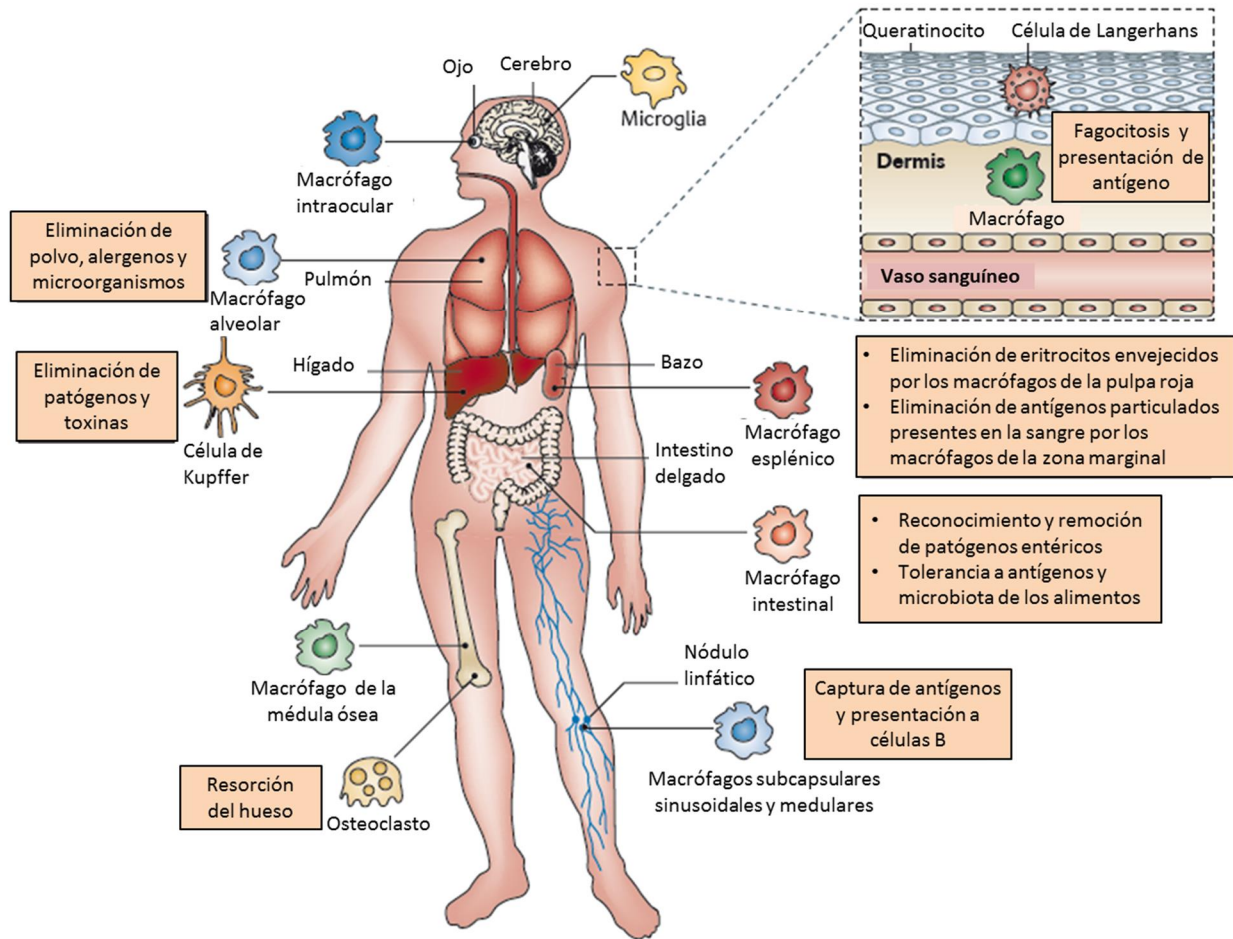
**Figura 1.11** La respuesta inmune humoral T-dependiente requiere la interacción de las células B activadas con las células T cooperadoras activadas [Adaptado de (Abbas et al. 2012b)].



Como se mencionó anteriormente, entre las estirpes celulares que conforman el sistema inmune, los macrófagos tienen un papel clave en la modulación de la respuesta ya que tienen un amplio repertorio de receptores que les permiten identificar diversas señales de daño. Además, están distribuidos por todo el organismo y se especializan para contribuir a la homeostasis del tejido en el que se encuentran. Asimismo, los macrófagos activados tienen la capacidad plástica de diferenciarse hacia diversos fenotipos funcionales según el microambiente que prevalezca a su alrededor, y así favorecer el tipo de respuesta que sea necesaria según la naturaleza del daño. Por la misma razón, la fisiología de los macrófagos debe ser regulada de una manera precisa, ya que sus funciones desreguladas pueden causar un daño tisular en lugar de eliminarlo.

#### **1.4 Fisiología de los macrófagos**

Los macrófagos están anatómicamente distribuidos prácticamente en todos los tejidos del organismo (Figura 1.6). Se recambian a partir de los monocitos que se encuentran en la circulación, que al incorporarse en los tejidos se diferencian a macrófagos. Éstos se especializan de acuerdo al tejido al que pertenecen e incluso reciben diferentes nombres según su ubicación. Los macrófagos participan en la respuesta inmune y pueden modularla a diferentes niveles. Pueden actuar directamente como efectores de la inmunidad innata, como se mencionó previamente, al fagocitar microorganismos patógenos, células infectadas, envejecidas o tumorales. Los macrófagos también secretan citocinas pro-inflamatorias y tienen la capacidad de transferir o presentar antígenos a los linfocitos (Martínez-Pomares y Gordon 2007), de tal manera que juegan un papel clave en la transición de la respuesta inmune innata a la adaptativa. Asimismo, pueden contribuir a la etapa de resolución de la respuesta inmune al secretar citocinas anti-inflamatorias. Por otra parte, los macrófagos participan en funciones dirigidas a preservar la homeostasis tales como la cicatrización de heridas, la remodelación de tejidos, la vigilancia inmunológica y el mantenimiento de la tolerancia ante lo propio (Murray y Wynn 2011).



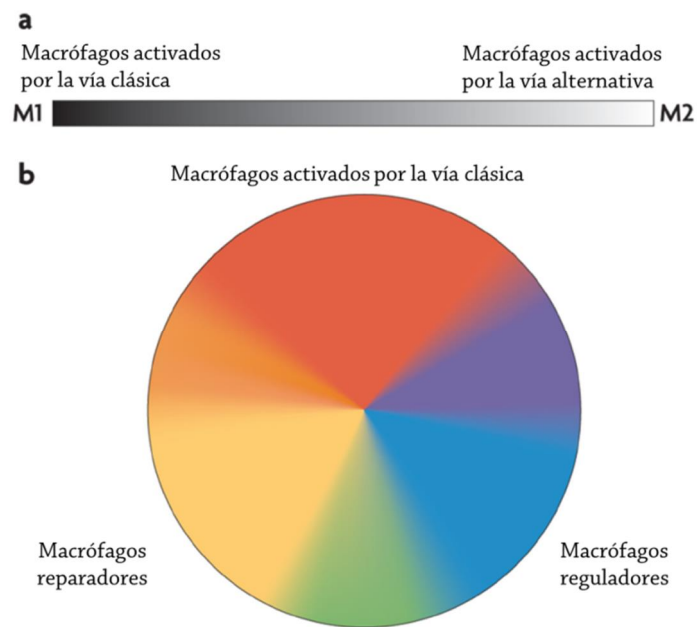
**Figura 1.6** Los macrófagos residentes están distribuidos en todo el organismo y llevan a cabo funciones especializadas que contribuyen a mantener la homeostasis de los tejidos en los que se encuentran. Además, en los órganos linfoides, están localizados de forma estratégica para desempeñar sus funciones de vigilancia inmunológica. [Adaptado de (Murray y Wynn 2011)].

Para cumplir con este amplio repertorio de funciones los macrófagos han desarrollado plasticidad para diferenciarse en diferentes fenotipos, de acuerdo con las señales que reciben del ambiente extracelular y de las interacciones que establecen con otras células. Los macrófagos son sensibles a las señales endógenas de daño y responden a ellas mediante su activación y diferenciación. Los fenotipos de activación más estudiados son los que se encuentran en extremos fisiológicos opuestos, es decir, los fenotipos M1 y M2, con características pro-inflamatorias y anti-inflamatorias respectivamente (Mosser y Edwards 2008). El fenotipo M1 se desarrolla una vez que estas células son activadas por la “vía clásica”, que

comprende la presencia de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y/o ligandos de receptores tipo Toll (TLRs: *Toll-like receptors*). Los macrófagos M1 tienen una mayor actividad microbicida y tumoricida y secretan diversas citocinas pro-inflamatorias y otros mediadores bioquímicos implicados en la respuesta inmune de tipo celular (Murray y Wynn 2011). De esta manera el fenotipo M1 tiene un papel clave en la defensa del organismo, sobre todo ante microorganismos intracelulares y procesos tumorales; sin embargo, su activación debe ser regulada, ya que las citocinas que produce (IL-1, IL-6, IL-23) pueden favorecer el desarrollo de patologías inflamatorias de tipo autoinmune. En contraste, el fenotipo denominado “regulador” ( $M_{reg}$ ), se desarrolla en presencia de glucocorticoides, prostaglandinas, complejos inmunes, ligandos de TLRs, células apoptóticas, entre otros factores (Lichtnekert et al. 2013; Mosser y Edwards 2008). Se requiere la presencia de dos de estas señales para inducir la diferenciación hacia este fenotipo, que se caracteriza por la secreción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ . Asimismo, los  $M_{reg}$  contribuyen a la disminución de la producción de IL-12. Este fenotipo se favorece en las etapas tardías de la respuesta inmune adaptativa, y su función es la de contribuir a la fase de resolución para limitar la inflamación. Sin embargo, existen microorganismos patógenos que emulan las señales de activación antes mencionadas e inducen el desarrollo de  $M_{reg}$  cuyas capacidades fagocíticas y microbidas están disminuidas y por lo tanto el microorganismo puede proliferar y diseminarse. De manera similar, los macrófagos asociados a tumores (TAMs: *Tumor-Associated Macrophages*) adoptan un fenotipo similar al regulador y pueden favorecer el crecimiento tumoral y la metástasis (Cassetta et al. 2011). El fenotipo M2, también se conoce como “reparador” (*wound-healing macrophages*) y tiene un papel clave en la cicatrización de heridas (Mosser y Edwards 2008; Murray y Wynn 2011). Los M2 responden a las señales tempranas de daño tisular, entre ellas la IL-4 producida por basófilos y células cebadas. La IL-4 induce en éstos la producción de los componentes de la matriz extracelular. Esta citocina, junto con la IL-13, es secretada en el contexto de la respuesta inmune tipo  $T_H2$ , y los macrófagos expuestos a estas citocinas desarrollan el fenotipo reparador, en el que sus capacidades fagocíticas, microbidas y de presentación de antígenos están disminuidas. La falta de regulación de la actividad de los M2 resulta perjudicial para el organismo cuando se genera fibrosis tisular excesiva. Asimismo, estos

macrófagos pueden ser más susceptibles a la infección por microorganismos intracelulares (Cassetta et al. 2011; Mosser y Edwards 2008).

Es importante destacar que los macrófagos conservan la plasticidad que les permite diferenciarse hacia uno u otro fenotipo de los anteriormente descritos, además de fenotipos intermedios o híbridos, que comparten características de más de uno de ellos (Figura 1.7). Esta plasticidad les confiere la capacidad de responder rápidamente ante los estímulos de su microambiente.



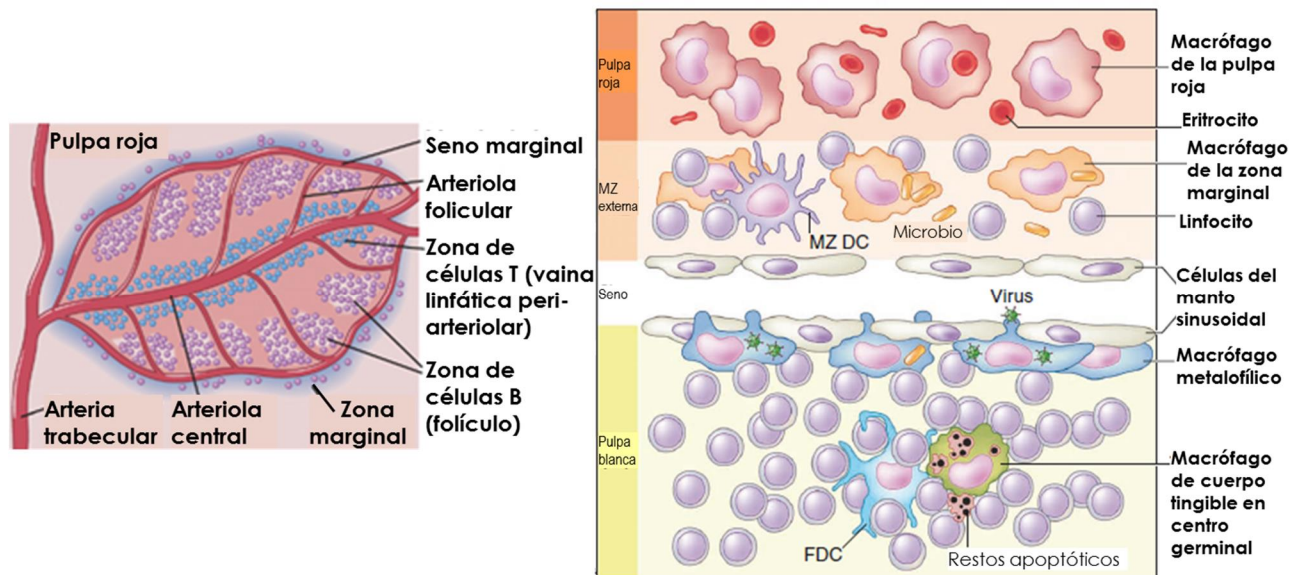
**Figura 1.7** Los macrófagos tienen plasticidad para diferenciarse hacia diversos fenotipos funcionales según los estímulos del microambiente que los rodea. Esto les permite realizar todo un espectro de funciones desde la defensa del organismo hasta la supresión de la respuesta inmune, así como la reparación y remodelación de tejidos dañados. Los autores de esta figura utilizan el espectro de colores para simbolizar que pueden existir fenotipos funcionales intermedios entre los extremos que se definieron inicialmente (M1 y M2, panel a) y los que se reconocen actualmente (panel b). [Adaptado de (Mosser y Edwards 2008)].

### 1.4.1 Los macrófagos del bazo

El bazo es un órgano linfoide secundario que está anatómicamente organizado en secciones que se conocen como pulpa roja y pulpa blanca. La región que rodea y delimita a las anteriores se denomina zona marginal. En cada una de estas regiones del bazo hay subpoblaciones distintas de macrófagos con funciones específicas relacionadas con su ubicación y con los tipos celulares con los que tienen contacto (Figura 1.8) (den Haan y Kraal 2012). Los macrófagos de la pulpa roja se especializan en la eliminación de eritrocitos envejecidos, así como en el reciclaje del hierro. Los macrófagos de la pulpa blanca están ubicados tanto en la zona de células T (la vaina linfática periarteriolar) así como en los folículos de células B. En estos folículos, los macrófagos

eliminan las células B apoptóticas que se generan en los centros germinales durante los procesos de hipermutación somática y de cambio de isotipo de las inmunoglobulinas.

En la zona marginal del bazo existen dos poblaciones de macrófagos, los llamados “de la zona marginal” (MZM: *Marginal Zone Macrophages*) y los macrófagos metalofílicos (MMM: *Marginal Metallophilic Macrophages*). La anatomía de la zona marginal del bazo permite que el flujo de sangre sea más lento y que los macrófagos estratégicamente localizados en esta zona, reconozcan y eliminen microorganismos patógenos presentes en la sangre. Para ello, tanto los MZM como los MMM expresan un repertorio amplio de receptores y moléculas de superficie que les permiten reconocer antígenos. Además, ambos subtipos de macrófagos producen citocinas que contribuyen a la respuesta ante estos patógenos, tales como IFN-tipo I, IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$  (den Haan y Kraal 2012).



**Figura 1.8** El bazo tiene cuatro poblaciones de macrófagos que desempeñan funciones especializadas según su localización dentro del órgano. MZ: zona marginal, MZ DC: célula dendrítica de la zona marginal FDC: célula dendrítica folicular [Adaptado de (Abbas et al. 2012) y (Davies et al. 2013)]

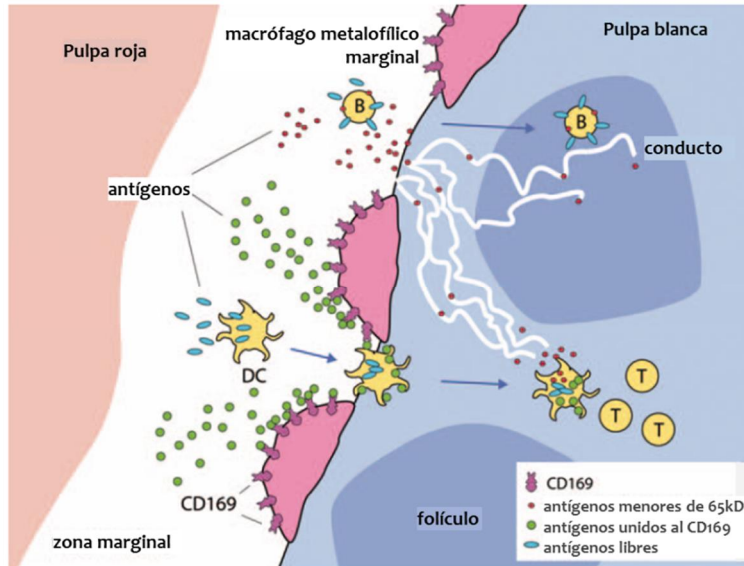
En la zona marginal del bazo también reside una población específica de linfocitos B así como DCs que pueden ser estimuladas por antígenos y migrar a la pulpa blanca. Estas células así como

los linfocitos y granulocitos que transitan continuamente por la zona marginal, pueden interactuar con los macrófagos residentes (den Haan y Kraal 2012).

Estudios recientes indican que los macrófagos ubicados en la zona marginal del bazo son indispensables para la formación de los centros germinales, ya que reclutan y organizan a los linfocitos B activados por antígeno en el perímetro folicular para generar la reacción de centro germinal (Nikbakht et al. 2013).

En la rata, tanto los MZM como los MMM expresan el marcador de superficie CD169 (O'Neill et al. 2013), también conocido como sialoadhesina. Como su nombre lo dice, este marcador une moléculas de ácido siálico presentes en diversos antígenos particulados. Los MMM del bazo podrían actuar de manera similar a los macrófagos de los senos subcapsulares de los nódulos linfáticos, que son capaces de unir antígenos particulados y transportarlos en la superficie de la membrana hasta el interior de los folículos de células B, en donde éstas pueden reconocer el antígeno y activarse para iniciar la respuesta inmune adaptativa. Este mecanismo se ha considerado una manera de presentación de antígenos específica de esta subpoblación de macrófagos (Martínez-Pomares y Gordon 2007). Asimismo, los MMM pueden transportar los antígenos de la zona marginal hacia la pulpa blanca y en ella transferirlos a las células dendríticas para que éstas a su vez presenten dicho antígeno a las células T. De esta manera, los macrófagos CD169<sup>(+)</sup> contribuyen a inducir la respuesta inmune de tipo citotóxico (Backer et al. 2010).

En general, los macrófagos CD169<sup>(+)</sup> llevan a cabo la función de reconocimiento y eliminación de patógenos y secreción de citocinas pro-inflamatorias, clásica de la respuesta inmune innata. Sin embargo, a través de la sialoadhesina, estos macrófagos también capturan y concentran antígenos y establecen interacciones con los linfocitos B y T para inducir la respuesta inmune adaptativa (Figura 1.9) (den Haan y Kraal 2012). Los macrófagos CD169<sup>(+)</sup> también tienen un papel clave en mantener la tolerancia ante lo propio al no desencadenar una respuesta inflamatoria tras la fagocitosis de células apoptóticas o restos celulares (McGaha et al. 2011; O'Neill et al. 2013).



**Figura 1.9** Los macrófagos CD169<sup>(+)</sup> del bazo capturan y concentran antígenos que luego transfieren a las células dendríticas que a su vez los presentan a los linfocitos en la pulpa blanca para desencadenar la respuesta adaptativa [Adaptado de (den Haan y Kraal 2012)].

Dado que sus funciones son principalmente pro-inflamatorias, los macrófagos CD169<sup>(+)</sup> están involucrados en la respuesta inmune anti-tumoral y de acuerdo con diversos modelos de estudio se considera que pueden ser un blanco efectivo para el desarrollo de vacunas con antígenos tumorales. En contraste, en el caso de las enfermedades autoinmunes, los macrófagos CD169<sup>(+)</sup> podrían participar en detrimento del organismo ya que se ha encontrado que en su ausencia, la proliferación de linfocitos T reguladores ( $T_{reg}$ ) es mayor y esto correlaciona con una menor severidad del padecimiento. Sin embargo, no se ha establecido si la expresión de CD169<sup>(+)</sup> en los macrófagos tiene un efecto causal en el inicio o en la progresión de la patología autoinmune, o es una consecuencia del proceso inflamatorio (O'Neill et al. 2013).

### 1.5 Opioides endógenos derivados de la Proencefalina A (PEA).

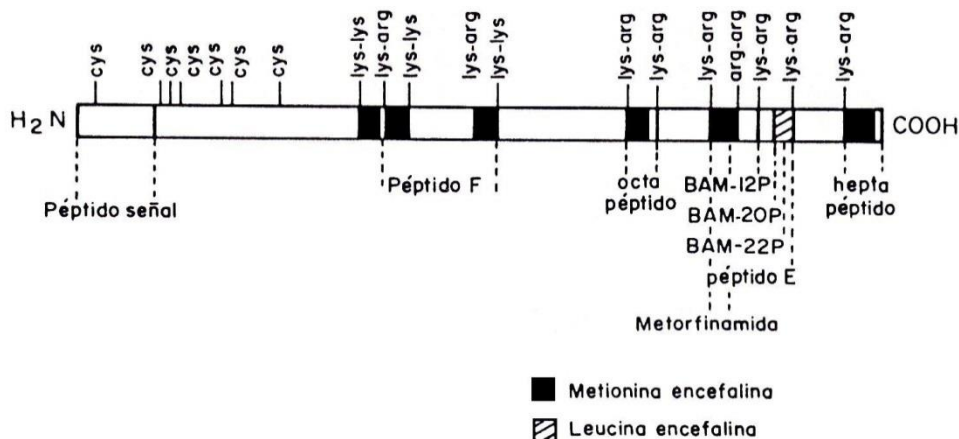
Los opioides endógenos son péptidos que reciben su nombre por la capacidad que tienen de unirse y activar a los receptores del opio y sus derivados (opiáceos). Los receptores de la morfina fueron descubiertos en 1973 (Pert y Snyder 1973; Simon et al. 1973; Terenius 1973). Este hecho desencadenó el estudio del sistema endógeno opioide basado en la hipótesis de que al haber receptores celulares específicos para una sustancia exógena como la morfina, probablemente existirían moléculas análogas que fueran los ligandos endógenos de dichos receptores. La búsqueda de moléculas endógenas con estructura química similar a la morfina



resultaron infructuosas, hasta que en 1975 los estudios de Terenius y colaboradores (1975) sugirieron que la naturaleza bioquímica de los ligandos endógenos es peptídica. Las encefalinas fueron los primeros péptidos opioides identificados y caracterizados. La secuencia de estos pentapéptidos fue publicada por Hughes y Kosterlitz (1975). La secuencia de los 4 primeros aminoácidos es idéntica en ambos péptidos y sólo difieren en el aminoácido carboxilo terminal: metionina para la Met-Encefalina (MENk), y leucina para la Leu-Encefalina.

Met-Encefalina	$\text{NH}_2\text{-Tyr}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^3\text{-Phe}^4\text{-Met}^5\text{-COOH}$
Leu-Encefalina	$\text{NH}_2\text{-Tyr}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^3\text{-Phe}^4\text{-Leu}^5\text{-COOH}$

Actualmente se conocen tres familias principales de péptidos opioides, todos derivados de proteínas precursoras que por escisión enzimática generan los péptidos biológicamente activos. De la proopiomelanocortina se deriva la  $\beta$ -endorfina, de la prodinorfina se generan las dinorfinas A y B, y finalmente de la proencefalina A (PEA) se generan las encefalinas antes mencionadas, así como el octapéptido  $\text{Met}^5\text{-Encefalina-Arg}^6\text{-Gly}^7\text{-Leu}^8$  (MERGL) y el heptapéptido  $\text{Met}^5\text{-Encefalina-Arg}^6\text{-Phe}^7$  (MERF) en el extremo carboxilo terminal. La secuencia de aminoácidos de la PEA tiene 4 copias de MENk (Udenfriend y Kilpatrick 1983).



**Figura 1.12** Representación de la estructura de la Proencefalina A (PEA) [Adaptado de (Asai y Gutiérrez 1994)].



Existen tres tipos principales de receptores opioides:  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ . Los péptidos opioides derivados de la PEA se unen con mayor afinidad al receptor opioide  $\delta$ , aunque también pueden unirse al receptor opioide  $\mu$ . La MENk además es conocida como el factor de crecimiento opioide (OGF: *Opioid Growth Factor*) por sus funciones al unirse al receptor OGF-R. Recientemente, el estudio del sistema OGF/OGF-R ha cobrado relevancia en el contexto del cáncer (McLaughlin y Zagon 2012). Tanto los péptidos opioides como sus receptores están ampliamente distribuidos en el organismo y están involucrados en diversas funciones, por lo que se considera que son moduladores de la homeostasis (Akil et al. 1998). Entre las funciones que se han descrito para el sistema endógeno opioide se encuentran: la tolerancia y la dependencia a fármacos, la ingesta de alimentos y líquidos, el aprendizaje, la memoria, el funcionamiento gastrointestinal, renal y cardiovascular, la termorregulación, la respiración, el embarazo, el desarrollo, el envejecimiento, el movimiento y la percepción del dolor (Bodnar 2012). Asimismo, se les ha asociado a patologías como la depresión, la epilepsia y el cáncer. Además de las funciones antes mencionadas, el sistema endógeno opioide está involucrado en procesos de inmunomodulación y en la comunicación neuroendocrino-inmunológica.

### **1.5.1 Síntesis de encefalinas en células del sistema inmune**

Las diversas estirpes celulares del sistema inmune son capaces de producir y liberar péptidos opioides derivados de la PEA. Se ha reportado la expresión de este precursor y la presencia de los péptidos biológicamente activos en linfocitos de rata (Behar et al. 1991; Rosen et al. 1989), así como la liberación de encefalinas inducida por la activación mitogénica de linfocitos humanos (Padros et al. 1989). Asimismo, Zurawski y cols. (1986) demostraron que la estimulación antigénica o mitogénica de una línea de linfocitos  $T_H$  de ratón, induce la expresión del ARNm de la preproencefalina A y la liberación de material opioide al medio de cultivo. Las células polimorfonucleares (granulocitos) también producen y liberan péptidos derivados de la PEA (Vindrola et al. 1990). En monocitos de origen humano se encontró que estos péptidos se producen y se liberan en respuesta a la estimulación con el éster de forbol PMA, y que su procesamiento postraduccional es diferencial según el tipo de célula (Kuis et al. 1991). Los monocitos liberan MENk y péptidos que contienen su secuencia como el péptido F, mientras que en los linfocitos T se genera material de mayor peso molecular que no es inmunorreactivo a

MEnk hasta después de ser sometido a un tratamiento proteolítico. De manera similar, Kamphuis y colaboradores (1998) reportaron que la estimulación de linfocitos T de sangre humana con anticuerpos monoclonales anti-CD2/CD28, así como la estimulación de monocitos con lipopolisacárido (LPS), induce la producción y secreción de MEnk y otros péptidos intermediarios de mayor peso molecular que contienen la secuencia de la MEnk (MECPs: *MEnk-containing peptides*). La expresión del ARNm de la preproencefalina A también se ha demostrado en líneas celulares linfoides y mieloides, así como en macrófagos y células cebadas de origen murino (Martin et al. 1987).

Los receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  también se expresan en las diferentes células del sistema inmune (Sharp 2003, 2006), por lo que las acciones inmunomoduladoras de los péptidos opioides pueden ser autocrinas o paracrinas.

### **1.5.2 Modulación de la fisiología de los macrófagos y de la respuesta inmune por encefalinas**

Se han descrito diferentes funciones inmunomoduladoras de los péptidos derivados de la PEA, en particular de la MEnk. Este péptido participa tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, al modular funciones de diversas células inmunocompetentes en las etapas tempranas de la respuesta. Se ha propuesto que esta modulación constituye una estrategia de supervivencia del organismo (Salzet y Tasiemski 2001).

En células mononucleares de sangre humana la MEnk estimula la quimiotaxis hacia el sitio de lesión tisular (van Epps y Saland 1984). En macrófagos del peritoneo de ratón la MEnk estimula la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  (Yang y Li 1989) e IL-6 (Kowalski et al. 2000). Resultados similares se han encontrado a partir de la microglia en el SNC (Das et al. 1995; Kowalski et al. 2002). Asimismo, tanto la MEnk como agonistas selectivos de los receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  modulan la actividad metabólica de los macrófagos al estimular la producción de óxido nítrico (Kowalski 1998a; Marotti et al. 1998; Vujic et al. 2004) y de peróxido de hidrógeno (Radulovic et al. 1995; Vujic-Redzic et al. 2000). Estos agentes oxidantes son necesarios para la destrucción eficiente de los microorganismos fagocitados.

Por otra parte, en macrófagos peritoneales de rata el grupo de Foris y colaboradores (1986) reportó un efecto estimulante de la MEnk (en el rango de  $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  M) sobre la citotoxicidad

dependiente de anticuerpos IgG2a y simultáneamente un efecto inhibitorio de la fagocitosis mediada por el receptor Fc $\gamma$ . Este efecto fue bidireccional y dependiente de la concentración, ya que con  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  M de MENk se encontró el efecto opuesto. El incremento en la fagocitosis inducido por MENk se demostró también en un modelo de malaria murina, en el que el tratamiento conjunto con el factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y MENk *in vivo*, eliminó la parasitemia casi en su totalidad. En los animales tratados la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales aumentó 100 veces, mientras que el porcentaje de macrófagos del bazo así como su capacidad fagocítica aumentó aproximadamente 7 veces respecto de los animales que no recibieron el tratamiento (Singh y Singh 2001).

La MENk también incrementa la actividad tumoricida de los macrófagos de peritoneo murino, en presencia de IFN y LPS (Hagi et al. 1994). En estudios recientes se demostró que el aumento en la actividad tumoricida de los macrófagos puede deberse a que la MENk es capaz de inducir *in vivo* la polarización funcional de los TAMs hacia el fenotipo M1. En concordancia con esta evidencia, en ensayos *in vitro* con macrófagos derivados de la médula ósea, el tratamiento con MENk incrementó la actividad tumoricida, la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS: *Reactive Oxygen Species*) y la producción de IL-12p40 y TNF- $\alpha$ , mientras que disminuyó la producción de la citocina anti-inflamatoria IL-10 (Chen et al. 2012).

Respecto a las funciones de la MENk en la respuesta inmune adaptativa, se ha reportado que esta encefalina es capaz de inducir la maduración de las DCs hacia un fenotipo especializado en la presentación de antígenos. De esta manera la MENk, al actuar sobre la función de las CPAs como las DCs y los macrófagos, contribuye a inducir la respuesta de las células T CD4<sup>(+)</sup> (Shan et al. 2011).

La MENk también puede estimular directamente a los linfocitos T. Se ha demostrado que estas células de origen murino (Kowalski 1998b) o humano (Hucklebridge et al. 1990; Singh et al. 1999) expresan los receptores opioides  $\delta$ , a través de los cuales la MENk y otros agonistas inducen la proliferación, la movilización del calcio intracelular y la producción de citocinas. En células T de la línea Jurkat en las que se transfectó el receptor opioide  $\delta$ , un agonista de este receptor indujo la expresión de IL-2 mediante el incremento de la actividad del factor de transcripción NF-AT/AP-1 (Hedin et al. 1997; Sharp et al. 1998). Asimismo, Yang y Li (1992)

encontraron que el tratamiento *in vivo* e *in vitro* con MEnk incrementa la producción de IL-2 de manera paralela al aumento en la proliferación de los linfocitos T. Este efecto no estuvo asociado a un aumento en la expresión del receptor de IL-2.

En concordancia con las evidencias mencionadas, la activación de los linfocitos T *in vivo* o *in vitro* induce la expresión de los receptores opioides  $\delta$  (Sharp et al. 2000; Sharp et al. 1998). La inducción de estos receptores está estrictamente mediada por la señal coestimuladora producida por la unión a la molécula CD28 en la membrana del linfocito T durante su activación (Nguyen y Miller 2002). Asimismo, en otras estirpes celulares como los macrófagos y las células NK, agonistas del receptor opioide  $\delta$  (House et al. 1996) o la MEnk (Marotti et al. 1994) inducen la producción de citocinas y la actividad citotóxica, respectivamente.

## 2. Planteamiento del problema

En trabajos previos se demostró que la exposición a LL durante 15 días reduce el contenido tisular y la liberación de encefalinas en estructuras del SNC de la rata (Asai et al. 2007; Asai et al. 2010). De manera similar, en órganos linfoides tales como el timo y el bazo de estos animales, el contenido tisular de MEnk está disminuido (Valdés-Tovar et al. 2003). En concordancia, los esplenocitos presentan una menor cantidad del precursor proteico Proencefalina A, lo cual sugiere que la síntesis de encefalinas en el bazo está alterada en esta condición.

En los animales expuestos a la luz constante la concentración sérica de melatonina nocturna está disminuida y presenta valores semejantes a los del día. Asimismo, tras recibir un estímulo antigénico, el número de células secretoras de IL-2 e IFN- $\gamma$ , así como el número de células plasmáticas productoras de anticuerpos fue menor, lo que indica una deficiencia en la respuesta inmune humoral primaria de estos animales (Valdés-Tovar 2007).

Dado que los macrófagos cumplen un papel clave en la defensa del organismo y pueden polarizar la respuesta inmune mediante su interacción con otras células inmunocompetentes, en este trabajo se estudió la producción de péptidos que contienen MEnk (MECPs) en una población de macrófagos esplénicos cultivados, provenientes de animales expuestos a la luz constante.

## 3. Hipótesis

Si la exposición a la luz constante reduce el contenido tisular de encefalinas y de su precursor proteico en el bazo de la rata, es factible que la síntesis de péptidos que contienen Met-Encefalina (MECPs) en los macrófagos esplénicos esté disminuida en esta condición.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Evaluar la síntesis de MECPs en macrófagos esplénicos cultivados provenientes de animales expuestos a la luz constante.

### 4.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la exposición a la luz constante:
  - en la actividad general de las ratas.
  - en el contenido tisular esplénico de MENk durante un periodo de 24 h.
  - sobre la producción de MECPs en macrófagos esplénicos.
- Evaluar el efecto farmacológico de MENk y la participación de los receptores opioides en la respuesta inmune inducida *in vitro*.
- Evaluar el efecto de restablecer el ciclo luz-oscuridad en la producción de MECPs y en la respuesta inmune inducida *in vitro*.

## 5. Metodología

### 5.1 Reactivos

El medio de cultivo y los suplementos fueron adquiridos a GIBCO® Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA) y el Ficoll-Paque® PLUS se adquirió a GE Healthcare (Uppsala, Suecia). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD169 de rata se compró a AbD Serotec (Kidlington, Reino Unido). Los anticuerpos secundarios conjugados a biotina y a rodamina (TRITC) se obtuvieron de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, EUA). El antisuero policlonal anti-Met-Encefalina-sulfóxido [MEnk-(o)] fue producido por el Dr. Asai y colaboradores. Las propiedades de reactividad cruzada de este antisuero fueron reportadas previamente (Asai et al. 1998). El anticuerpo monoclonal anti-VAMP-1/2 (IgM), así como el anticuerpo secundario anti-IgM de ratón conjugado a fluoresceína (FITC) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA). La MEnk pura fue adquirida de los laboratorios Peninsula-BACHEM (San Carlos, CA, EUA). El estuche para la metodología ELISA se obtuvo de R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA; R2000: Rat IL-2 ELISA). La sangre de borrego se obtuvo del CEPIPSA, UNAM (México). El resto de los reactivos químicos utilizados se adquirieron a Sigma-Aldrich™ Corporate (St. Louis, MO, EUA) o bien se indica su procedencia en el texto.

### 5.2 Animales

Ratas macho de la cepa Wistar (200-250 g) fueron alojadas en cajas de acrílico, con alimento y agua disponibles *ad libitum*. Tras un periodo de habituación de 5 días en condiciones de luz-oscuridad (LD) de 12:12 h (encendido de la luz a las 07:00 h), el grupo control permaneció en estas condiciones, mientras que el grupo experimental se expuso a la luz constante (LL) durante 15 días, con una intensidad de luz en un rango de 50 a 75 lux al nivel de la caja. La manipulación de los animales de laboratorio se llevó a cabo estrictamente de acuerdo con la normatividad bioética institucional, nacional e internacional.

### 5.3 Registro de la actividad general

Se colocaron 6 ratas en cajas de acrílico individuales en un casillero con ventilación y temperatura controladas ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ), en un cuarto de registro a prueba de ruido. El agua y el

alimento estuvieron disponibles *ad libitum* y la cama de los animales se cambió 1 vez por semana. Las condiciones de luz dentro del casillero fueron controladas de tal manera que se registró una línea base en la que los animales se expusieron a un ciclo de LD de 12:12 h, durante 5 días, en los que la luz se encendió a las 07:00h y se apagó a las 19:00h. Posteriormente los animales se expusieron a LL durante 15 días. La actividad general de los animales se registró mediante un sistema de monitoreo automático como se describió previamente (Tapia-Osorio et al. 2013). Brevemente, cada caja se colocó sobre una placa metálica con sensores de presión para detectar de manera continua el movimiento general de los animales. Los datos obtenidos a partir de los sensores se recolectaron mediante un sistema de digitalización y se almacenaron automáticamente en una computadora para su posterior análisis. Tanto el sistema para el registro de la actividad como el software para el análisis de los datos (PC SPAD9) fueron desarrollados por la compañía Omnia S.A. de C.V. (México, D.F.).

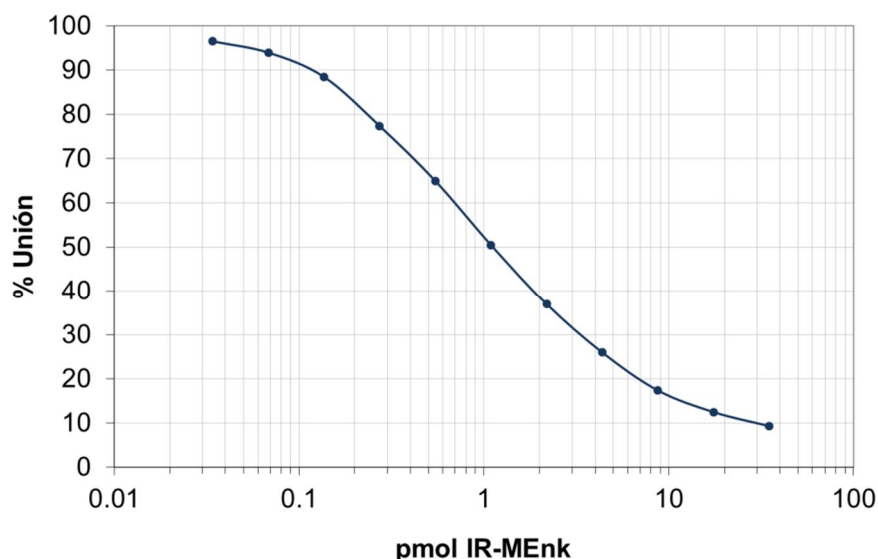
Se construyeron actogramas dobles para cada animal, en los que se representa el número de cuentas de actividad registradas cada 15 minutos durante los 20 días de registro (5 días en LD seguidos de 15 días en LL). Para determinar el periodo diario de cada rata se obtuvieron periodogramas mediante el análisis de  $\chi^2$  para la línea base y los últimos 5 días en LL. Asimismo, para visualizar el patrón temporal de actividad se obtuvo un perfil de actividad promedio (n=6 ratas) para la línea base y los últimos 5 días en LL.

#### **5.4 Determinación del contenido de Met-Encefalina (MENk) en el bazo durante un periodo de 24 horas**

Las ratas que fueron sometidas a condiciones de LD o LL fueron sacrificadas en intervalos de 4 h a partir de las 09:00 h durante un periodo de 24 h. Se obtuvieron los bazos y se homogeneizaron para obtener un extracto tisular como se describió previamente (Valdés-Tovar et al. 2003) (Ver Apéndice 1). Los extractos esplénicos se cargaron en columnas de Amberlita XAD-2 (Rohm and Haas, Philadelphia, PA, USA) para la extracción de péptidos en fase sólida. La elución de la fracción peptídica se llevó a cabo con metanol absoluto. Las muestras fueron liofilizadas, resuspendidas y oxidadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.6% para la posterior cuantificación de MENk. El radioinmunoensayo se realizó con un trazador yodinado y el antisuero para MENk-(o), como se reportó previamente (Asai et al. 1998) y se describe con detalle en el Apéndice 1. Cada muestra



se ensayó por triplicado. Los valores obtenidos de las muestras problema se interpolaron en una curva patrón que se realizó con concentraciones conocidas de MENk pura (Figura 5.1). El contenido de proteína en los extractos peptídicos esplénicos se determinó por el método de Lowry. Los resultados se expresan como pmol de MENk inmunorreactiva (IR-MENk)/mg de proteína.



**Figura 5.1** Representación gráfica de una curva patrón utilizada para la cuantificación de MENk por radioinmunoensayo.

## 5.5 Aislamiento y cultivo de esplenocitos mononucleares

Los animales se sacrificaron por decapitación y se disecó el bazo en condiciones asépticas. El bazo se disgregó mecánicamente presionando contra una malla de acero inoxidable (200 mesh) para obtener suspensiones celulares en solución salina balanceada (BSS) [D-glucosa 5.55 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.44 mM,  $\text{NaHPO}_4$  1.33 mM,  $\text{CaCl}_2$  1.26 mM, KCl 5.36 mM, NaCl 137 mM,  $\text{MgCl}_2$  1.09 mM,  $\text{MgSO}_4$  0.81 mM, rojo de fenol 0.0001%]. Los esplenocitos mononucleares se aislaron por centrifugación sobre Ficoll-Paque® PLUS a 1000 x g, 20 min, 22°C (Boyum 1968). Las células se lavaron dos veces con BSS y se cultivaron a una densidad de  $2.5 \times 10^6$  células/mL en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, HEPES 25mM, L-glutamina 2mM, penicilina 100 unidades/mL, estreptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y anfotericina B 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Después de 6 días de incubación a 37°C en atmósfera húmeda con  $\text{CO}_2$  5%, se retiraron las células no adherentes y los macrófagos se conservaron en cultivo. Para prevenir la actividad enzimática de las

encefalinasas se agregó fenilalanina - alanina (Phe-Ala) 0.1 mM al medio de cultivo, 4 horas antes de la fijación o de la lisis celular (Patey et al. 1981).

## **5.6 Inducción *in vitro* de la respuesta inmune**

Se estimularon muestras de  $5 \times 10^6$  esplenocitos mononucleares obtenidos de ratas expuestas a LD y LL, con una suspensión de glóbulos rojos de carnero (GRC) al 2% v/v (dilución final) (Mond y Brunswick 2000) y fueron incubados con 10 nM naloxona o 0.1 nM MENk durante 72 h. Los sobrenadantes de estos cultivos fueron recolectados y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la posterior determinación de IL-2.

## **5.7 Tinciones por inmunofluorescencia**

Para la caracterización de los macrófagos esplénicos, las preparaciones se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% durante 15 minutos y se lavaron 2 veces con PBS 0.01M pH 7.4. Las muestras se permeabilizaron con Tween-20 0.1% por 1 h, se lavaron 2 veces y se bloquearon con BSA 2% durante 1 h. Después del bloqueo, las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD169 diluido 1:150 en BSA 1% - Tween-20 0.05% durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras dos lavados para eliminar el anticuerpo primario, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con TRITC, dilución 1:300, por 1 h a temperatura ambiente.

Para la caracterización de las estructuras granulares inmunorreactivas a MENk, los macrófagos cultivados se fijaron como se describió anteriormente. Las muestras se incubaron con amortiguador de citratos 10 mM pH 6.0 a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 20 min para el desenmascaramiento de epítopes. Posteriormente se permeabilizó con Triton X-100 0.25% durante 20 minutos y se incubó con  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.6% por 10 min para oxidar la MENk. Después de bloquear los sitios de unión inespecífica con caseína 0.5% - Triton X-100 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente, las células se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo anti-VAMP-1/2 y el suero anti-MENk-(o), dilución 1:200, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de lavados exhaustivos, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-IgM de ratón conjugado con FITC (1:100) y anti-IgG de conejo conjugado con TRITC (1:250) por 2 h, a temperatura ambiente. La tinción inespecífica se determinó por incubación con caseína 0.5% en lugar de los anticuerpos primarios.

Para ambos casos, los núcleos se tiñeron con DAPI 300 nM durante 5 minutos. Se obtuvieron fotomicrografías mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon TE-2000 (Tokio, Japón) acoplado a un sistema de adquisición de imágenes digitales y el software NIS-Elements.

## **5.8 Caracterización del suero anti-MEnk-(o)**

La especificidad del suero anti-MEnk-(o) utilizado en este estudio se realizó mediante Dot blot. Brevemente, se aplicaron alícuotas de 2  $\mu$ L de MEnk pura en membranas de nitrocelulosa que posteriormente se fijaron con PFA 4% - glutaraldehído 0.25% por 15 min (Hulen et al. 1991). Las membranas se incubaron con glicina 1M por 15 min, se lavaron con TBS y posteriormente se incubaron con  $H_2O_2$  0.2% para oxidar la MEnk. Tras el bloqueo de los sitios de unión inespecífica con caseína 0.5%, las membranas se incubaron con el antisuero para MEnk-(o), diluido 1:1000, durante 2h. Se realizaron lavados exhaustivos con TBS y las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa, diluido 1:10,000. Los sitios de unión (spots) se revelaron por quimioluminiscencia. Las imágenes se adquirieron con un densitómetro GS-800 de Bio-Rad. Como control negativo de la inmunodetección, se sustituyó el antisuero para MEnk-(o) por caseína 0.5%.

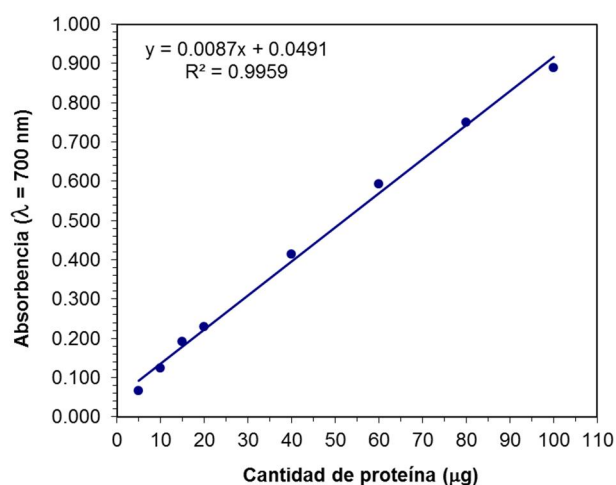
## **5.9 Incorporación de $^{35}S$ -Metionina e inmunoprecipitación de péptidos que contienen MEnk (MEnk-containing peptides: MECPs).**

Los macrófagos cultivados fueron incubados durante 5 h con 3.6  $\mu$ Ci de  $^{35}S$ -Metionina (1175.0 Ci/mmol) (Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Posteriormente se descartaron los sobrenadantes, se realizó un lavado y se obtuvo un extracto celular por lisis y raspado con amortiguador RIPA [Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM,  $Na_3VO_4$  1 mM, NaF 10 mM, aprotinina 1  $\mu$ g/mL, pepstatina 1  $\mu$ g/mL, leupeptina 1  $\mu$ g/mL]. Estos extractos se incubaron con  $H_2O_2$  0.6% a temperatura ambiente durante toda la noche para la oxidación de la MEnk. Cada muestra se dividió en triplicados y se tomó una alícuota para la determinación de proteínas. Posteriormente, las muestras se inmunoprecipitaron con el antisuero específico para MEnk-(o), diluido 1:300, a 4°C durante toda la noche. Se realizó una segunda precipitación con células de *S. aureus* (*Pansorbin*<sup>®</sup> cells, Calbiochem<sup>®</sup>-EMD Millipore; Billerica, MA, USA) al 10%, dilución final 1:6, durante 2 h en baño de hielo. Las muestras se centrifugaron a 3000 x g por 5

min y después a máxima velocidad por 1 min para lograr un paquete celular compacto. Tras descartar el sobrenadante de cada muestra, el paquete celular se lavó 2 veces y se resuspendió en 100  $\mu$ L de PBS. Se agregó líquido de centelleo Sigma-Fluor® (10 mL/muestra) y la radiactividad presente en las muestras se determinó como cuentas por minuto (cpm) con el contador de centelleo líquido Beckman-Coulter LS6500 (Fullertone, CA, USA).

## 5.10 Determinación de proteínas

La cantidad de proteínas en las muestras se determinó mediante el método de Lowry (1951), utilizando albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) para la curva estándar (Figura 5.2). El límite de sensibilidad de esta técnica es de 5  $\mu$ g. La determinación espectrofotométrica se llevó a cabo a una longitud de onda de 700 nm en un instrumento Biomate3 de Thermo®.

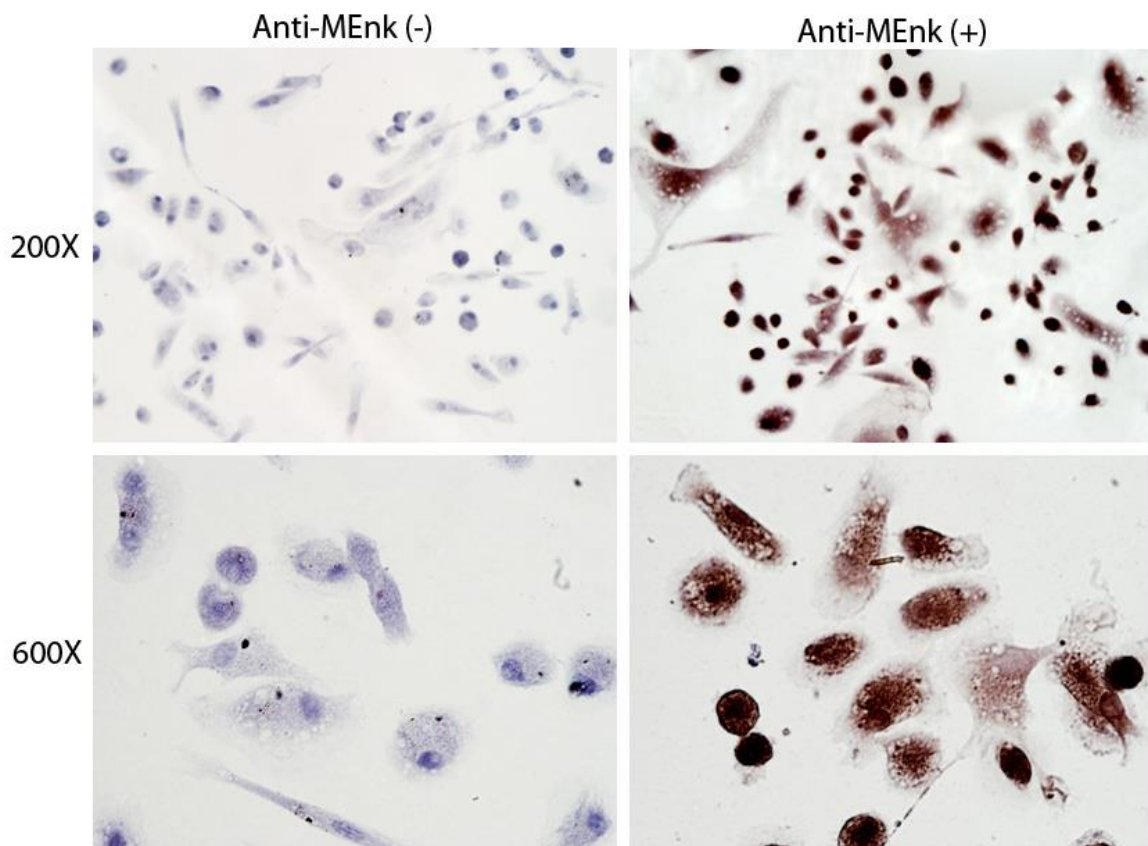


**Figura 5.2** Representación gráfica de una curva patrón de BSA utilizada para la determinación de proteínas.

## 5.11 Detección inmunocitoquímica de MECPs

Los macrófagos esplénicos cultivados se fijaron con PFA 4% durante 15 minutos y enseguida se realizaron 2 lavados con PBS 0.01M pH 7.4. Las preparaciones se incubaron con un amortiguador de citrato de sodio 10 mM pH 6.0, a 55°C, durante 20 min para desenmascaramiento de epítopes. Posteriormente, se permeabilizó con Triton X-100 0.5% durante 20 min, seguido de la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.6% por 10 min para depletar la actividad de peroxidasas endógenas y para la oxidación de MEnk. Tras el bloqueo con suero de burro 3% - Triton X-100 0.25% durante 30 min a temperatura ambiente, las células se incubaron toda la

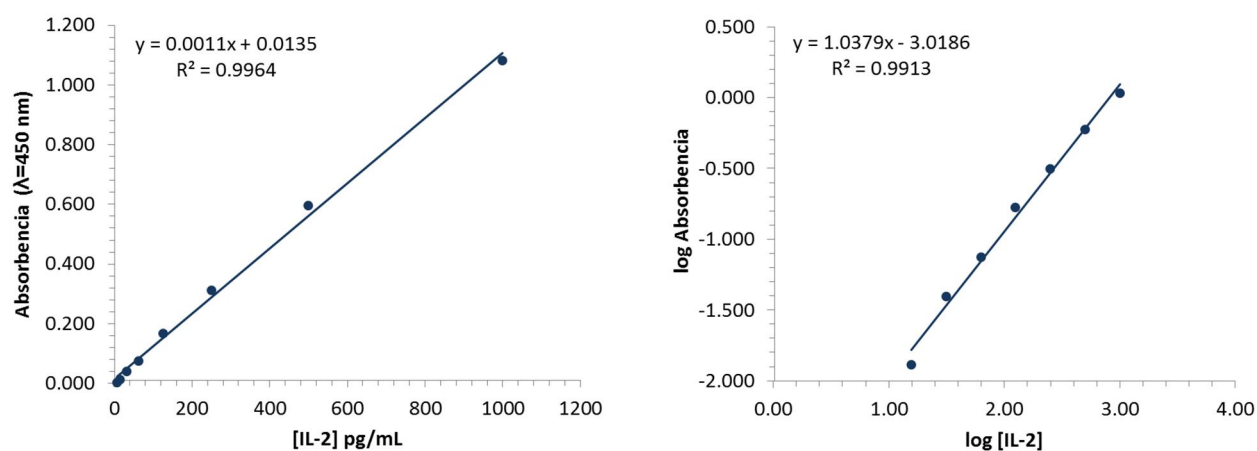
noche con el antisuero específico contra MENk-(o), dilución 1:200, a 4°C. Tras lavados exhaustivos con PBS, las células se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con biotina, diluido 1:250, durante 2 h a temperatura ambiente. Para llevar a cabo la reacción de color se utilizaron los estuches comerciales Vectastain® ABC kit Elite Standard y DAB/Ni como sustrato (ambos de Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó una contratinción del citoplasma y el núcleo celular con hematoxilina-eosina. Se obtuvieron fotomicrografías con un microscopio Nikon TE-2000 acoplado a un sistema de adquisición de imágenes. La densidad óptica del material inmunorreactivo a MENk se determinó mediante el software de análisis de imágenes Image Pro® Plus (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).



**Figura 5.3** Control de especificidad de la detección de MECPs por inmunocitoquímica. En el panel izquierdo se muestra el control negativo en el que se omitió el antisuero anti-MENk, mientras que en el panel derecho se muestra la tinción positiva para MENk.

## 5.12 Determinación de IL-2

La concentración de IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos fue determinada mediante la metodología ELISA. Los ensayos se realizaron de acuerdo con el protocolo provisto por el fabricante. Brevemente, alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de cada muestra así como de los estándares para la curva de IL-2 incluidos en el estuche comercial, se incubaron por 2 h en microplacas preadsorbidas con un anticuerpo de captura específico para IL-2 de rata. El sistema de detección consistió de un anticuerpo para IL-2 conjugado a peroxidasa, seguido de TMB como sustrato de la enzima. Inmediatamente después de detener la reacción con HCl, se realizó la lectura de la densidad óptica a 450 nm mediante el detector multimodal Beckman Coulter DTX-880 (Fullertone, CA, USA). Los valores de las muestras problema se transformaron e interpolaron en la curva patrón de tipo log-log como la que se muestra en el panel derecho de la figura 5.4.



**Figura 5.4** Representación gráfica de las curvas patrón utilizadas para la determinación de IL-2 por ELISA. A la izquierda se muestra la gráfica de los valores de absorbancia vs. la concentración de IL-2 de los estándares provistos en el estuche comercial. A la derecha se muestra la curva log-log que se utiliza para determinar con mayor exactitud la concentración de IL-2 en los sobrenadantes del cultivo.

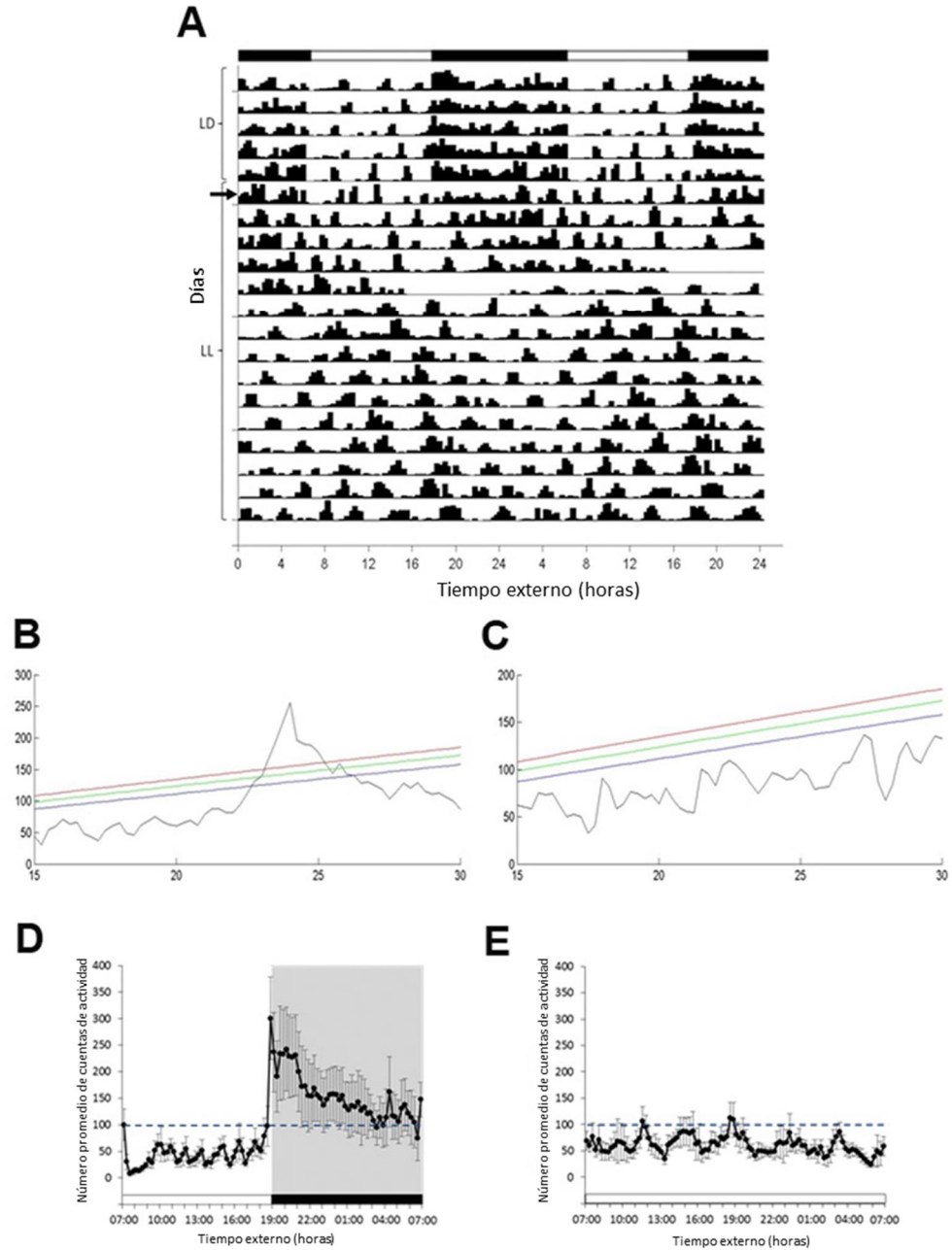
## 5.13 Análisis estadístico

Las diferencias entre dos grupos se determinaron mediante la prueba t de Student o la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test. Las comparaciones entre más de dos grupos se realizaron mediante ANOVA de una vía, seguida por Holm-Sidak como prueba *post hoc*. Se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p fue  $<0.05$ .

## 6. Resultados

### 6.1 Registro de la actividad general

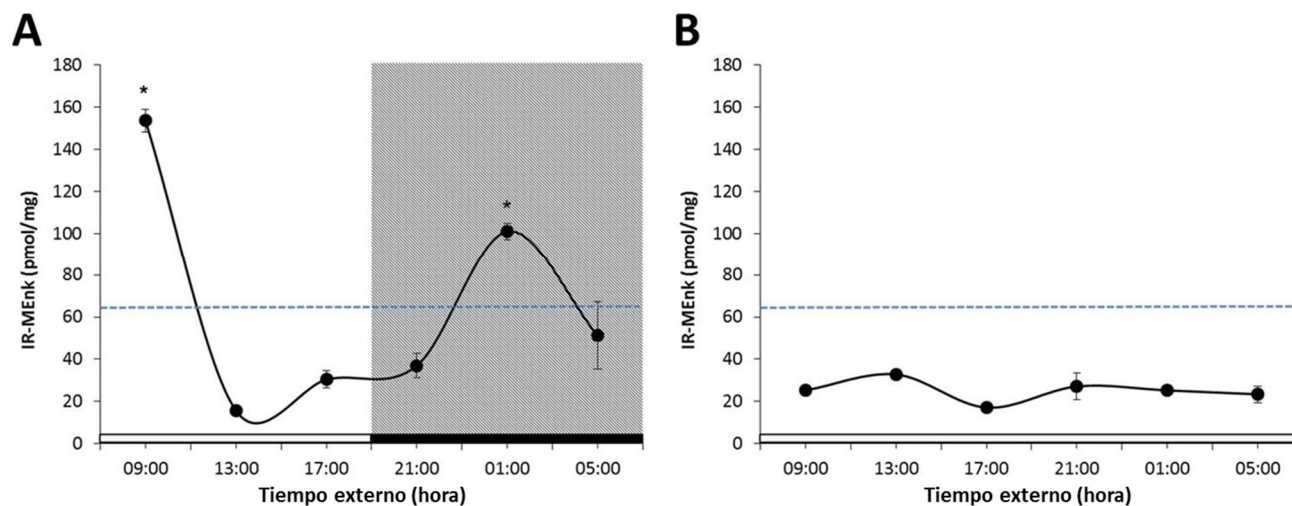
**Figura 6.1. Registro de la actividad general.** Las ratas se expusieron a un ciclo luz-oscuridad 12:12h (LD) durante 5 días (línea base) y luego a luz constante (LL) durante 15 días. La actividad general se registró mediante sensores localizados bajo las cajas de los animales, como se describió en la sección de Metodología. En el panel A se muestra un actograma doble representativo. Los días de registro se representan en el eje de las ordenadas y las horas correspondientes al tiempo externo en el eje de las abscisas. El cambio de iluminación a luz constante se indica con la flecha negra.



Se presentan los periodogramas obtenidos mediante el análisis de  $\chi^2$ , correspondientes a la línea base de LD (panel B) y a los últimos 5 días de LL (panel C). Las líneas paralelas representan valores de significancia estadística. Los perfiles de actividad para cada condición se muestran en el panel D (línea base LD) y E (últimos 5 días de LL). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M (n=6 ratas). La línea punteada horizontal representa la media de actividad diaria durante el ciclo LD. Las barras horizontales blanca y negra representan el día y la noche respectivamente (paneles A, D y E).

Durante la línea base las ratas mostraron un ritmo de actividad robusto, sincronizado con el ciclo luz-oscuridad y con niveles máximos de actividad durante la fase de oscuridad. (Figura 6.1A, parte superior). Asimismo, el periodograma para la línea base indicó un periodo de 24 h (Figura 6.1B). A partir de que inició la exposición a la luz constante (Figura 6.1A, flecha), el ritmo en la actividad se fue perdiendo de forma gradual hasta que en los últimos días de LL no se observa una clara diferencia en la actividad a lo largo de 24 h (Figura 6.1A, parte inferior). El periodograma correspondiente a los últimos 5 días de la exposición a la luz constante confirma la pérdida de ritmicidad circadiana en la actividad general para todas las ratas (Figura 6.1C). Los perfiles de actividad promedio también mostraron un ritmo robusto durante la línea base en LD (Figura 6.1D) así como la pérdida de la ritmicidad circadiana en los últimos 5 días de LL (Figura 6.1E).

## 6.2 Determinación del contenido de Met-Encefalina en el bazo durante un periodo de 24 h



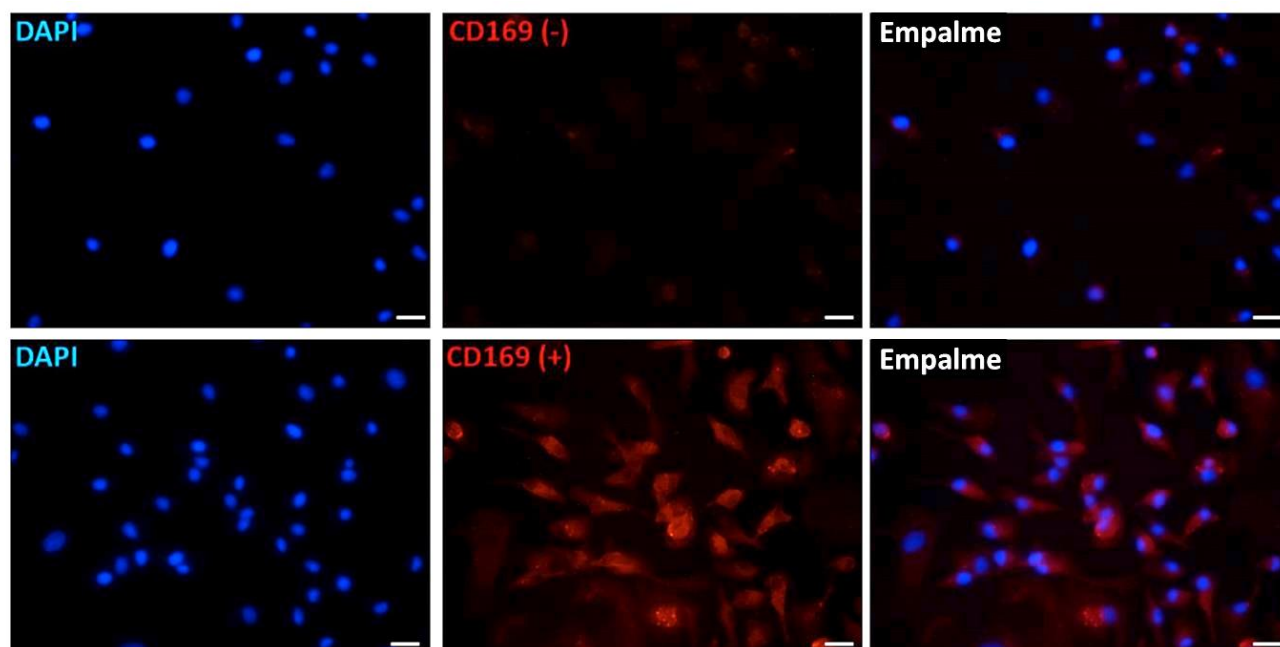
**Figura 6.2. Contenido esplénico de Met-Encefalina en un periodo de 24h.** El contenido de MENk se determinó por radioinmunoensayo en extractos peptídicos de bazo, obtenidos de animales expuestos a un ciclo luz-oscuridad 12:12h (Panel A) o luz constante (Panel B). Las muestras se obtuvieron en intervalos de 4h, durante 24 h. Los resultados se expresan como pmol de IR-MENk/mg de proteína (media  $\pm$  E.E.M., n=4). Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA de una vía y Holm-Sidak como prueba *post hoc*. Las barras horizontales blanca y negra representan el día y la noche, respectivamente. La línea punteada horizontal representa contenido promedio de MENk en el bazo durante el ciclo LD.



La figura 6.2A muestra que el contenido esplénico de MEnk determinado durante un periodo de 24 h presenta un patrón bifásico con un pico máximo a las 09:00 h (*Zeitgeber time* (ZT) 2) y un segundo pico a la 01:00 h (ZT18) para los animales sometidos a un ciclo LD. En contraste, el contenido tisular de MEnk en el bazo presentó niveles reducidos y sin una variación significativa durante el periodo de 24 h en los animales expuestos a LL (Figura 6.2B).

### 6.3 Caracterización de los macrófagos esplénicos en cultivo

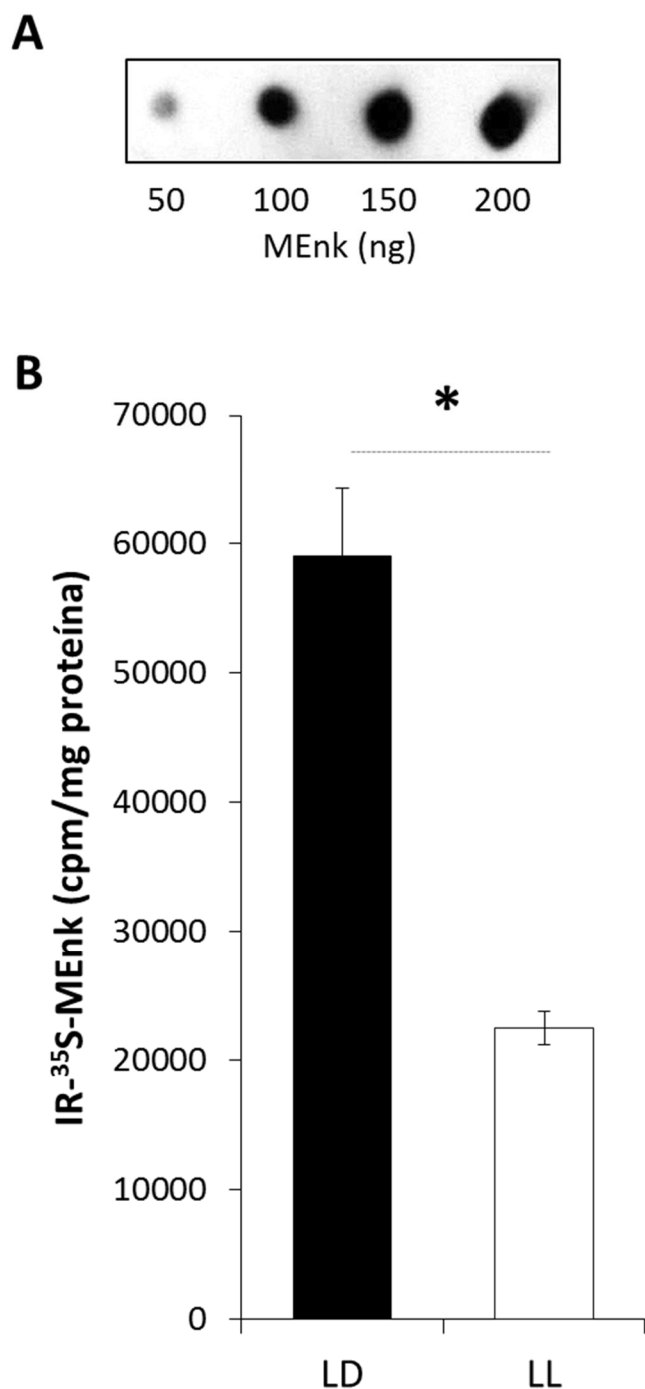
Los esplenocitos mononucleares son una población heterogénea compuesta por linfocitos, células dendríticas y macrófagos. Por lo tanto, para asegurar que el protocolo de aislamiento así como las condiciones de cultivo fueron los adecuados para obtener una población enriquecida en macrófagos esplénicos, las células en cultivo se caracterizaron mediante la inmunodetección del marcador de superficie sialoadhesina (CD169). En la figura 6.3, panel superior, se muestra el control negativo en el que el anticuerpo primario anti-CD169 fue omitido y no se observa inmunofluorescencia para dicho marcador. El panel inferior de la figura muestra la tinción positiva de los macrófagos CD169<sup>(+)</sup>, que corresponde al 96±1% de las células en cultivo.



**Figura 6.3. Caracterización de los macrófagos CD169(+) en cultivo.** Los esplenocitos mononucleares se aislaron y cultivaron como se describió en la metodología. En el 6° día de incubación, las células no adherentes se retiraron. Los macrófagos se fijaron para la inmunodetección con anti-CD169 y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a rodamina (TRITC). Los núcleos se tiñeron con DAPI. El panel superior muestra el control negativo en el que se omitió el primer anticuerpo. El panel inferior muestra la tinción de los macrófagos esplénicos CD169(+). Escala: 20  $\mu$ m.

## 6.4 Síntesis de péptidos que contienen Met-Encefalina (MECPs) en macrófagos esplénicos cultivados.

Para evaluar la síntesis de MENk, así como su contenido y distribución subcelular, se verificó la especificidad del antisuero para MENk-(o) por Dot blot. Como se muestra en la figura 6.4A, el antisuero utilizado en este estudio presentó una reactividad creciente conforme se aumentó la



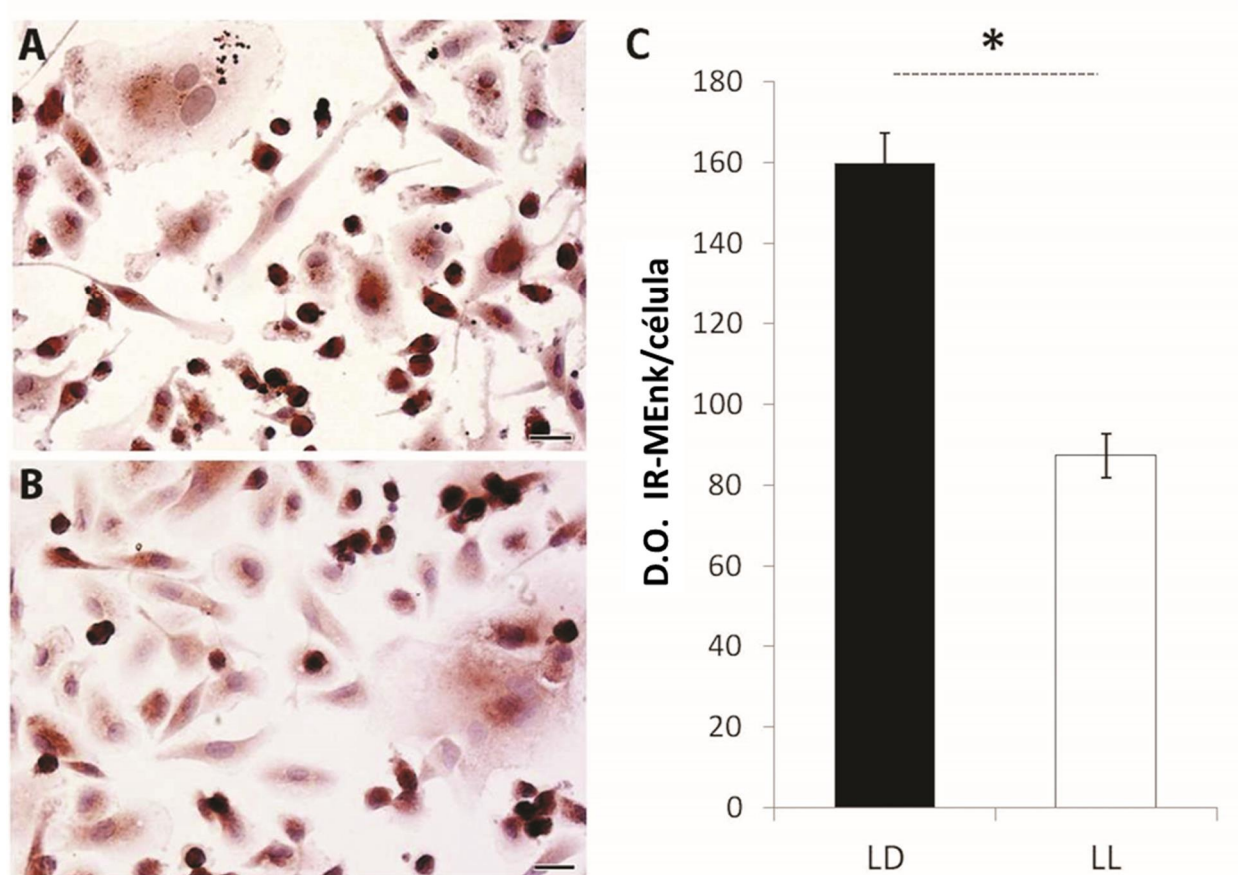
cantidad de MENk. No se observó reconocimiento inespecífico cuando las membranas se incubaron con caseína 0.5% en lugar del antisuero para MENk-(o) (no se muestra).

Se evaluó la síntesis *de novo* de MECPs mediante la incorporación de <sup>35</sup>S-metionina a las proteínas. La cantidad relativa de <sup>35</sup>S-MECPs disminuyó en un 62% en los inmunoprecipitados de macrófagos provenientes de animales expuestos a la luz constante, como se muestra en la figura 6.4B.

**Figura 6.4. Síntesis de péptidos que contienen MENk (MECPs) en macrófagos esplénicos cultivados.** El panel A muestra un Dot blot representativo para MENk. Cantidades crecientes de MENk pura se aplicaron en una membrana de nitrocelulosa y se inmunodetectaron con el antisuero para MENk-(o). El panel B muestra la síntesis *de novo* de MECPs en los macrófagos esplénicos cultivados provenientes de animales expuestos a luz-oscuridad 12:12h (LD) o luz constante (LL). Las células se incubaron con <sup>35</sup>S-metionina para su incorporación en las proteínas recién sintetizadas. Los extractos se inmunoprecipitaron con el antisuero para MENk-(o) y la radiactividad se detectó en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan como cpm/mg proteína (media ± E.E.M., n=6). La diferencia estadística se determinó mediante la prueba de Mann-Whitney Rank Sum Test \*p<0.001.

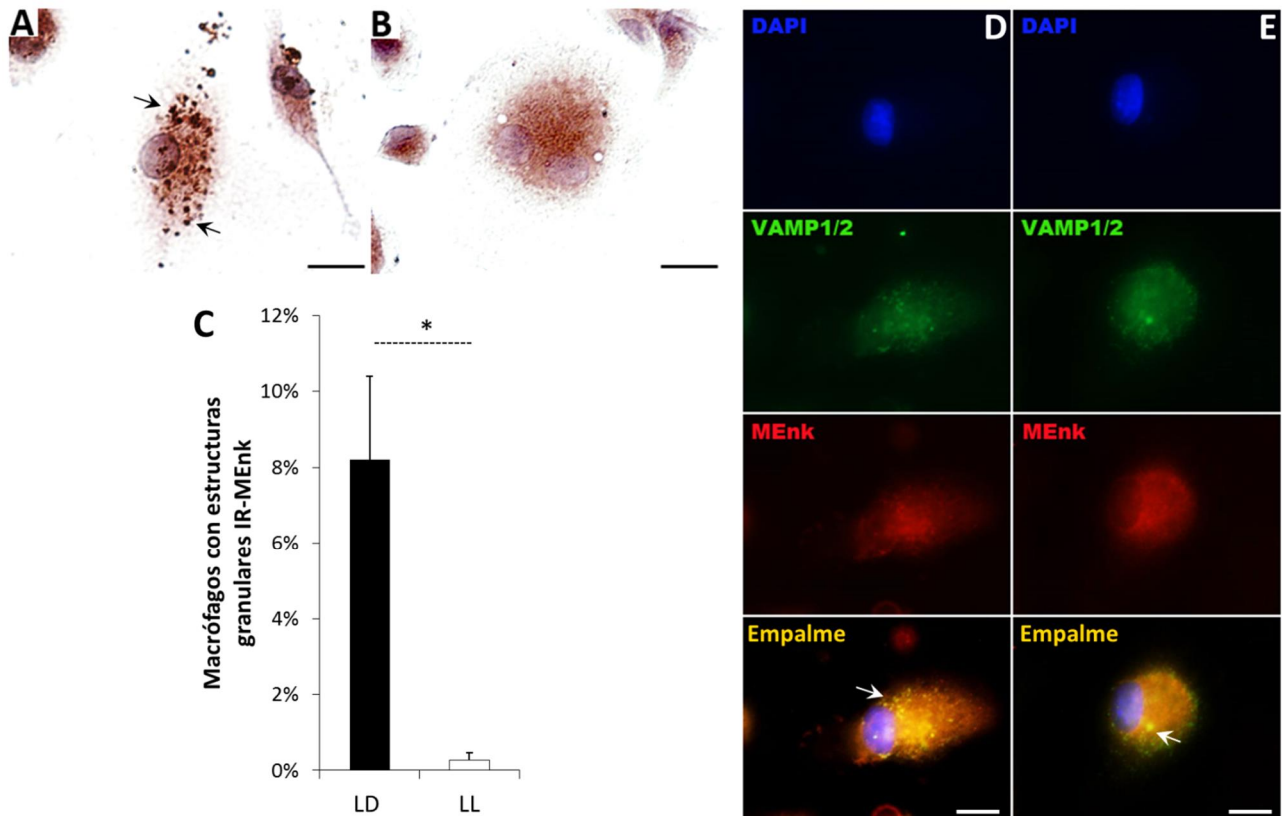
## 6.5 Inmunodetección de MECPs en macrófagos esplénicos

Para determinar la distribución intracelular de los MECPs y su cantidad relativa en los macrófagos esplénicos, se utilizó un antisuero específico anti-MEnk-(o) para realizar la inmunodetección. La figura 6.5 muestra que aproximadamente el 90% de los macrófagos derivados de animales sometidos a un ciclo luz-oscuridad (LD) o a la luz continua (LL) fueron inmunorreactivos a MEnk (Fig. 6.5A y 6.5B respectivamente). Sin embargo, la tinción para MECPs fue menor en los macrófagos de animales expuestos a la luz constante. El análisis densitométrico de la tinción para MECPs mostró una reducción del 40% en la densidad óptica por célula (D.O./célula) en los macrófagos de ratas expuestas a la luz continua (Fig. 6.5C).



**Figura 6.5. Inmunodetección de MECPs en macrófagos esplénicos cultivados.** Los paneles A y B muestran fotomicrografías representativas de macrófagos obtenidos de animales expuestos a un ciclo luz-oscuridad (LD) o luz constante (LL), respectivamente. Tras la fijación los macrófagos se incubaron con el antisuero para MEnk-(o), seguido de un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con biotina. La reacción de color se llevó a cabo con el estuche comercial Vectastain®ABC y DAB como sustrato para la peroxidasa. Escala: 20  $\mu$ m. El panel C muestra el análisis densitométrico del material inmunorreactivo a MEnk, determinado a partir de 20 campos elegidos al azar y expresado como la media de D.O./célula. \* $p < 0.05$  t-Student.

La distribución subcelular de los MECPs mostró un patrón punteado y una localización en estructuras semejantes a gránulos, bien definidas, de 1-2  $\mu\text{m}$ , en los macrófagos derivados de ratas sometidas a un régimen de luz-oscuridad (Fig. 6.6A). En contraste, los macrófagos provenientes de ratas en luz continua mostraron un patrón punteado de material inmunorreactivo a MENk; sin embargo, no se observan estructuras semejantes a gránulos (Fig. 6.6B).



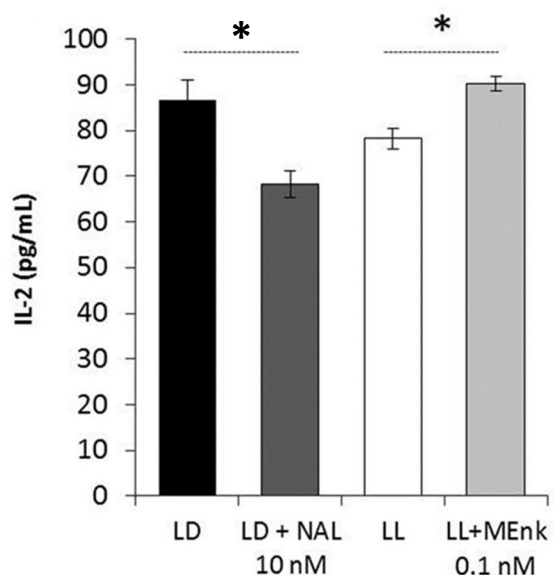
**Figura 6.6. Distribución subcelular de MECPs en macrófagos esplénicos cultivados.** Los paneles A y B muestran fotomicrografías representativas de macrófagos obtenidos de animales expuestos a un ciclo luz-oscuridad (LD) o luz constante (LL), respectivamente. Los macrófagos se incubaron con el antisuero para MENk-(o), seguido de un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con biotina. La reacción de color se llevó a cabo con el estuche comercial Vectastain<sup>®</sup>ABC y DAB como sustrato para la peroxidasa. Las flechas negras señalan las estructuras granulares inmunorreactivas a MENk. El panel C muestra el porcentaje de macrófagos que presentaron estructuras granulares IR-MENk >1  $\mu\text{m}$  determinado en 10 campos elegidos al azar para cada grupo \*p<0.05 t-Student. Paneles D y E: Caracterización de los gránulos secretores IR-MENk mediante el reconocimiento con el marcador de vesículas VAMP-1/2 en macrófagos de animales expuestos a LD (panel D) o LL (panel E). Los macrófagos se incubaron con el antisuero para MENk-(o) seguido de un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con rodamina (TRITC) y con el anticuerpo para VAMP-1/2 (IgM) seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fluoresceína (FITC). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las flechas blancas indican co-localización de MENk y VAMP-1/2 en los gránulos (color amarillo). Escala: 20  $\mu\text{m}$ .

La figura 6.6C muestra una reducción del 90% en la cantidad de macrófagos que presentan al menos una estructura tipo granular de material inmunorreactivo a MEnk en células de animales expuestos a la luz continua.

Para caracterizar las estructuras semejantes a gránulos que fueron inmunorreactivas a MEnk, los macrófagos esplénicos se tiñeron con el antisuero para MEnk-(o) y con un anticuerpo anti-VAMP-1/2, que reconoce un marcador proteico localizado específicamente en la membrana de las vesículas secretoras. Como se muestra en la figura 6.6D, tanto el anticuerpo contra VAMP-1/2 como el antisuero contra MEnk-(o) reconocieron estructuras vesiculares en los macrófagos obtenidos de animales expuestos a un régimen de luz-oscuridad y se observó una tinción co-localizada (Fig. 6.6D Empalme). En contraste, la tinción vesicular de MEnk fue escasa en macrófagos provenientes de animales expuestos a la luz continua (Figura 6.6E) y la co-localización con VAMP-1/2 es evidente en una sola vesícula (Fig. 6.6E Empalme). En estos macrófagos se observan vesículas que fueron inmunorreactivas únicamente para VAMP-1/2 (color verde).

## 6.6 Evaluación de la respuesta inmune inducida *in vitro* en esplenocitos mononucleares estimulados con eritrocitos de carnero.

Para evaluar la respuesta inmune *in vitro*, los esplenocitos mononucleares fueron estimulados con GRC y se determinó la concentración de IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos. La incubación con naloxona 10 nM disminuyó en un 20% la concentración de IL-2 en el

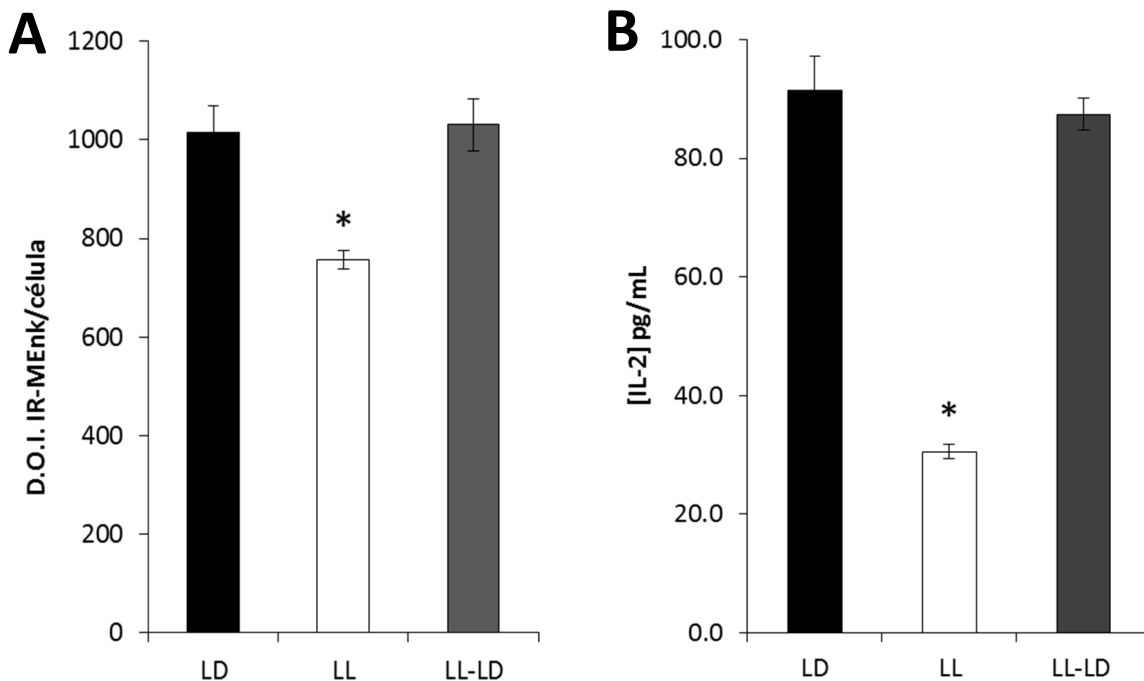


**Figura 6.7. Evaluación de la respuesta inmune inducida *in vitro*.** Los esplenocitos mononucleares derivados de las ratas expuestas a luz-oscuridad (LD) o luz constante (LL) fueron estimulados con eritrocitos de carnero e incubados con naloxona (NAL) o MEnk como se indica. La IL-2 se determinó mediante ELISA en los sobrenadantes de los cultivos. Los resultados representan la media  $\pm$  E.E.M.,  $n=4$ , dos experimentos independientes. \* $p<0.05$  ANOVA de una vía, Holm-Sidak prueba *post hoc*.

sobrenadante de los esplenocitos derivados de animales expuestos a un régimen de luz-oscuridad, mientras que el tratamiento con MEnk 0.1 nM, incrementó en un 15% la concentración de IL-2 en el medio de cultivo de los esplenocitos provenientes de animales expuestos a la luz continua (Fig. 6.7).

## 6.7 Evaluación del contenido de MECPs en macrófagos esplénicos y de la respuesta inmune inducida *in vitro* tras el restablecimiento del ciclo luz-oscuridad.

En animales que fueron expuestos a la luz constante durante 30 días y posteriormente se colocaron en condiciones de luz-oscuridad durante 5 ciclos (LL-LD), el contenido de MECPs en los macrófagos esplénicos, así como la concentración de IL-2 en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos estimulados con GRC se restableció respecto a los animales en luz constante, alcanzando valores similares a los de los animales en LD (Figura 6.8).



**Figura 6.8. Efecto del restablecimiento del ciclo luz-oscuridad.** Panel A: Contenido de MECPs. Los macrófagos esplénicos se obtuvieron de ratas expuestas a luz-oscuridad (LD), luz constante durante 30 días (LL) o de ratas que tras 30 días de LL recibieron 5 ciclos de LD (LL-LD). Tras la fijación, los MECPs se detectaron por inmunocitoquímica con el antisuero específico para MEnk. El contenido de MECPs se evaluó mediante la densidad óptica integrada (D.O.I.) de IR-MEnk/célula en 15 campos elegidos al azar para cada grupo. Panel B: Evaluación de la respuesta inmune inducida *in vitro*. Los esplenocitos mononucleares derivados de los grupos LD, LL y LL-LD se estimularon con GRC y se incubaron durante 72h. La IL-2 se determinó mediante ELISA en los sobrenadantes de los cultivos. Los resultados representan la media  $\pm$  E.E.M.,  $n=4$ . \* $p<0.05$  LL vs. LD y LL-LD, Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, Dunn's prueba *post hoc*.

## 7. Discusión

Los principales hallazgos de este trabajo fueron los siguientes: a) la exposición a la luz constante (LL) durante 15 días fue suficiente para desorganizar la ritmicidad circadiana en la actividad general de las ratas, b) en condiciones de luz-oscuridad (LD), el contenido tisular de Met-Enkefalina (MENk) en el bazo mostró un patrón bifásico en un periodo de 24 h, mientras que en LL no se observaron oscilaciones y el contenido tisular fue significativamente menor en todas las horas analizadas, c) la síntesis *de novo* de péptidos que contienen MENk (MECPs), su contenido intracelular y la presencia de estructuras granulares inmunorreactivas a MENk disminuyó significativamente en los macrófagos esplénicos CD169<sup>(+)</sup> derivados de animales expuestos a LL, d) los péptidos opioides y sus receptores modularon la secreción de IL-2 de los esplenocitos estimulados *in vitro* y e) el restablecimiento del ciclo de LD durante 5 días después de la exposición de las ratas a LL durante 30 días, revirtió la disminución en el contenido de MENk en los macrófagos esplénicos, así como en la secreción de IL-2 tras la estimulación *in vitro* de la respuesta inmune.

En los animales nocturnos que son expuestos a la luz constante, el ritmo de actividad locomotora presenta un periodo mayor a 24 h (Aschoff 1981), así como una disminución progresiva en la amplitud de sus oscilaciones circadianas (Pittendrigh 1981). Al tener un periodo mayor a 24 h en corrimiento libre, al paso de varios días el ritmo de actividad de los animales en LL presentaría una diferencia de fases respecto a los animales en LD. Esto hace que sea necesario determinar esta diferencia y el tiempo endógeno de los animales en LL para que la obtención de las muestras de ambos grupos se realice en tiempos equivalentes y sea comparable. En este estudio, durante los 5 días de exposición a LD la actividad general de las ratas mostró un ritmo circádico definido con un periodo significativo de 24 h, con niveles máximos durante la fase de oscuridad y niveles mínimos de actividad diurna como se ha descrito anteriormente para esta especie (Zhang y Sannajust 2000). En contraste, la exposición a LL durante 15 días fue suficiente para desorganizar la ritmicidad circadiana en la actividad de las ratas, como indican tanto el periodograma como el perfil de actividad promedio diaria. Al no haber fases circadianas de actividad distinguibles en las ratas expuestas a LL, se descarta que los cambios observados se deban a una diferencia en el tiempo endógeno de los animales.

Se han reportado dos tipos de resultados respecto al efecto de la exposición a la luz constante en la actividad locomotora de las ratas. Si se registra la actividad mediante una rueda de ejercicio, el ritmo persiste en corrimiento libre durante más de 15 días con un aumento del periodo de aproximadamente 1 h (Lax et al. 1999). El ejercicio realizado con la rueda refuerza la salida del sistema circadiano (ritmicidad), de tal manera que la actividad locomotora tiene una oscilación circadiana definida aún en condiciones constantes de iluminación (Lax et al. 1998; Yamanaka et al. 2013). En contraste, si la actividad se registra mediante un dispositivo sensor que se coloca bajo las cajas de los animales, como se realizó en este trabajo, el ritmo circadiano de actividad se pierde en un promedio de 13 a 20 días en LL, considerando la variación individual entre los animales y la intensidad de luz utilizada en los experimentos (Cambras et al. 2011, 2012; Novakova et al. 2011; Tapia-Osorio et al. 2013). Además, los animales tuvieron acceso libre al alimento, de tal manera que éste no representara una señal de tiempo externa para el sistema circadiano (Stephan 2002).

Existe evidencia de que la exposición a la LL produce una disminución en la amplitud o la desorganización de diversos ritmos fisiológicos tales como la expresión de la proteína mPER2 en el núcleo supraquiasmático (NSQ) (Sudo et al. 2003), la actividad neuronal del NSQ, el gasto metabólico y la resistencia a la insulina (Coomans et al. 2013), la producción de glucocorticoides y melatonina (Claustrat et al. 2008), la secreción de hormonas intestinales (Gil-Lozano et al. 2014), y la capacidad fagocítica de los neutrófilos (Hriscu et al. 2002), entre otros. En este trabajo, la exposición a la LL abatió el nivel de actividad de las ratas de tal manera que se observó un nivel de actividad semejante al diurno durante las 24 h. De manera similar, en estos animales el contenido tisular esplénico de MENk no presentó oscilaciones en un periodo de 24 h y fue significativamente menor en todas las horas analizadas. Esto es consistente con lo observado previamente en estructuras del SNC (Asai et al. 2007) y apoya la hipótesis de que la síntesis de encefalinas está afectada en esta condición de iluminación.

Como se mencionó anteriormente, la MENk se genera mediante la ruptura enzimática secuencial de su precursor proteico Proencefalina A (PEA). Existen varias enzimas que llevan a cabo este procesamiento como son las pro-hormona convertasas 1/3 y 2 (PC1/3 y PC2) (Hook et al. 1996; Rouille et al. 1995), y la catepsina L (Yasothornsrikul et al. 2003). Estas enzimas



generan diferentes patrones de MECPs (Hook et al. 2004; Hwang et al. 2007). A la fecha no se ha caracterizado plenamente la ruta proteolítica de la PEA en células del sistema inmune ni su regulación. Sin embargo, en macrófagos alveolares humanos se ha detectado la presencia de la PEA, la MEnk, las convertasas PC1 y PC2 y la carboxipeptidasa E (Krajnik et al. 2010). Por otra parte, los macrófagos también expresan la catepsina L (Beers et al. 2003), por lo que es posible que estas células tengan ambas rutas de procesamiento proteolítico de la PEA. En este trabajo se evaluó la síntesis *de novo* de MECPs y su contenido intracelular por inmunodetección con un antisuero específico contra MEnk. Este antisuero muestra menos de 0.01% de reactividad cruzada respecto a los péptidos con estructura relacionada (Asai et al. 1998) (ver Apéndice 1). Dada la alta especificidad de este antisuero, los péptidos derivados de la proteólisis enzimática de la PEA que tienen uno o más aminoácidos después de la secuencia de MEnk no son reconocidos. Por lo tanto, los péptidos inmunorreactivos al antisuero utilizado pueden ser el pentapéptido MEnk como tal, así como fragmentos de mayor peso molecular con la secuencia de MEnk en el extremo carboxilo terminal.

En trabajos anteriores, el contenido de encefalinas o de su precursor PEA se determinó en extractos del bazo completo y de los esplenocitos mononucleares, respectivamente (Valdés-Tovar et al. 2003; 2007). Sin embargo, dado que el bazo está compuesto por diversos tipos de células inmunocompetentes, en este trabajo se obtuvo una población enriquecida en macrófagos esplénicos positivos al marcador de superficie CD169. En la rata, tanto los macrófagos de la zona marginal como los macrófagos metalofílicos marginales expresan este marcador (O'Neill et al. 2013). Por su localización estratégica en la frontera entre la pulpa blanca y la pulpa roja del bazo, estos macrófagos realizan la identificación y eliminación de los patógenos que se encuentran en la sangre (den Haan y Kraal 2012) y también interactúan con las DCs (Backer et al. 2010) y con los linfocitos B activados por antígeno (Nikbakht et al. 2013). De esta manera, los macrófagos CD169<sup>(+)</sup> tienen un papel clave en la inducción de la inmunidad adaptativa en el bazo. Dado que las encefalinas modulan diversas funciones de los macrófagos y sus interacciones con otras células en el contexto de la respuesta inmune, se consideró relevante evaluar la producción de MECPs en esta población celular.

Los resultados mostraron una disminución significativa, mayor de 60%, en la síntesis *de novo* de MECPs en los macrófagos esplénicos CD169<sup>(+)</sup> derivados de animales expuestos a la LL, lo que corrobora nuestra hipótesis. En concordancia, el contenido intracelular de MECPs en estos macrófagos y la proporción celular que presentó estructuras granulares inmunorreactivas a MEnk fue menor. La co-localización de la proteína de membrana asociada a vesículas VAMP-1/2 y los MECPs en las estructuras granulares sugiere que los MECPs se almacenan en gránulos de secreción. Éstos podrían ser gránulos individuales semejantes a los que almacenan opioides endógenos en las células neuroendocrinas (Fischer-Colbrie y Frischenschlager 1985; Fleminger et al. 1983; Loh et al. 2002). Otra posibilidad es que se trate de estructuras vesiculares membranosas semejantes a las descritas para la  $\beta$ -endorfina en células del sistema inmune (Mousa et al. 2004). Por otra parte, la presencia de proteínas relacionadas con VAMP en macrófagos murinos y su probable participación en eventos de exocitosis han sido previamente documentados (Pitzurra et al. 1996; Shukla et al. 2000). De acuerdo con los hallazgos antes mencionados, la co-localización de MEnk y VAMP-1/2 en los macrófagos derivados de animales en LL es escasa lo que sugiere que estas células tienen una menor cantidad de MECPs almacenados, en contraste con lo que se observa en los macrófagos obtenidos de animales en LD. Hasta la fecha, los mecanismos específicos y la regulación de la secreción de MEnk en los macrófagos no se han elucidado.

Como se mencionó previamente, la MEnk modula diversos aspectos de la fisiología de los macrófagos, así como de las células con las que interactúan en el contexto de la respuesta inmune. Para inducir la transición de la respuesta inmune innata a la adaptativa, los macrófagos actúan directamente como células presentadoras de antígeno o bien, transfieren los antígenos a las DCs para que éstas a su vez realicen dicha función (Backer et al. 2010; Martínez-Pomares y Gordon 2007). También los macrófagos favorecen la activación de los linfocitos mediante la secreción de citocinas. La activación de los linfocitos T, la estimulación de su expansión clonal así como su polarización funcional, son eventos tempranos que resultan críticos en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa y que si no se llevan a cabo de manera óptima se altera el resultado final de la misma. En un trabajo anterior demostramos que existe una deficiencia en la respuesta inmune humoral primaria de las ratas expuestas a la luz constante. Ante un reto

antigénico con GRC, el bazo mostró un menor número de células formadoras de anticuerpos IgM, así como un número reducido de células secretoras de citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  (Valdés-Tovar 2007). Estas citocinas participan en los eventos tempranos de la respuesta antes mencionados (expansión clonal de linfocitos T y polarización funcional) (Gagro y Gordon, 1999; Kasproicz et al., 2003; Nishimura et al., 2002). Ya que la MEnk es un modulador directo de la activación de los linfocitos y también participa en la interacción entre las DCs y los linfocitos T (Li et al. 2014; Li et al. 2012; Liu et al. 2012; Shan et al. 2011), es factible que la disminución en la síntesis de MECPs en los macrófagos esplénicos de las ratas expuestas contribuya al compromiso de la respuesta inmune primaria. En este sentido, los resultados obtenidos tras la inducción *in vitro* de la respuesta inmune en presencia de naloxona sugieren que la producción de IL-2 es modulada por la secreción de péptidos opioides de los esplenocitos y la estimulación de los receptores opioides. Si bien la cantidad de IL-2 secretada por las células de animales expuestos a LL no mostró una disminución estadísticamente significativa, la incubación con MEnk produjo un incremento lo que corrobora su participación en la secreción de esta citocina. Como parte de la continuación de este proyecto se ha considerado evaluar si la incubación con MEnk revierte el efecto de la naloxona, así como el efecto de este antagonista en la secreción de IL-2 a partir de células de animales en LL. Además, la determinación de la cantidad de MEnk en el sobrenadante de estos cultivos nos permitirá evaluar si hay diferencias en la secreción de este péptido en células de animales expuestos a LD y LL.

Los mecanismos que subyacen a la regulación de la síntesis de encefalinas en los macrófagos en relación a las condiciones de iluminación ambiental, no han sido caracterizados. Sin embargo, uno de estos mecanismos puede estar mediado por la melatonina, ya que su secreción nocturna constituye una de las vías eferentes del sistema circadiano. Se ha reportado que la exposición a la luz constante (en un rango desde 0.2 hasta 300 lux) suprime la producción de melatonina de la glándula pineal, con una clara disminución de la amplitud de su ritmo circadiano (Blask et al. 2009; Claustrat et al. 2008; Mendez et al. 2012). En condiciones experimentales similares a las de este trabajo encontramos que la concentración sérica de melatonina de las ratas expuestas a LL, determinada a las 01:00 h, mostró valores similares que durante el día subjetivo, en contraste con el incremento en los valores nocturnos de esta indolamina en las ratas expuestas

a LD (Valdés-Tovar 2007). Asimismo, resultados previos de nuestro grupo de trabajo indican que la disminución en el contenido tisular de encefalinas tanto en estructuras del SNC como en órganos linfoides de los animales expuestos a LL es revertida por la administración de una dosis única de melatonina exógena en un lapso de 4 h (Asai et al. 2007; Asai et al. 2010; Valdés-Tovar et al. 2003). El incremento en el contenido tisular de encefalinas fue parcialmente bloqueado por la administración de luzindol, un antagonista de los receptores membranales de melatonina (Asai et al. 2007; Asai et al. 2010). Asimismo, la exposición a 6 h de oscuridad, con el consecuente incremento en la concentración sérica de melatonina, restableció el contenido tisular de encefalinas en el hipotálamo y el hipocampo de los animales expuestos a LL (Asai et al. 2007). En conjunto, esta evidencia sugiere que la melatonina modula de forma endógena la síntesis de encefalinas a nivel central y periférico, en respuesta a los cambios en la luz ambiental.

A su vez, la relación funcional entre los opioides endógenos y la melatonina se asocia con la fisiología del sistema inmune. La melatonina ejerce diversas funciones inmunomoduladoras (Carrillo-Vico et al. 2013) y en condiciones experimentales o fisiopatológicas en las que su síntesis está disminuída se ha encontrado desregulación del sistema inmune (Cardinali et al. 2008; Maestroni et al. 1986). En este contexto, Maestroni y Conti (1992) propusieron la existencia de una red pineal-inmune-opioide cuya función sería la de optimizar la capacidad de respuesta del sistema inmune y contrarrestar los efectos inmunosupresores del estrés y de otras condiciones medioambientales adversas. Sus evidencias sugieren que los efectos inmunoestimulantes de la melatonina están mediados por un mecanismo opioidérgico, ya que son bloqueados por el antagonista opioide naltrexona (Maestroni et al. 1987, 1988). En el primero de estos estudios, la administración vespertina de melatonina estimuló la respuesta inmune humoral de los ratones ante un reto antigénico con GRC, mientras que la administración de naltrexona abatió este efecto (Maestroni et al. 1987). Posteriormente, demostraron que el estrés agudo por restricción en ratones genera una disminución en el peso del timo y en la respuesta inmune humoral contra GRC, y que una dosis sub-letal del virus de la encefalomiocarditis en estos animales incrementa la mortalidad en un 80% respecto a los animales no estresados. La administración vespertina de melatonina revirtió los efectos

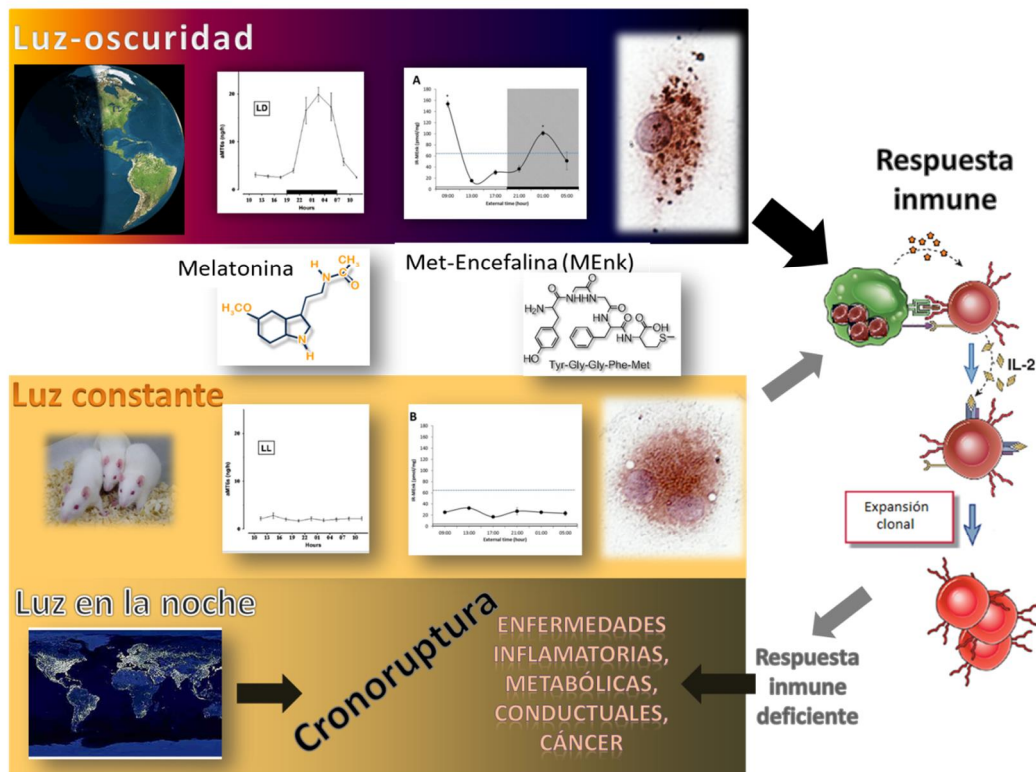
inmunosupresores del estrés agudo mientras que la administración de naltrexona abolió el efecto de melatonina (Maestroni et al. 1988). En concordancia, resultados previos indican que la administración vespertina de melatonina durante 4 días posteriores a un reto antigénico con GRC contrarresta la reducción en el número de células secretoras de citocinas (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) en ratas expuestas a LL. El efecto de la melatonina fue parcialmente bloqueado por el antagonista de sus receptores de membrana luzindol, así como por la naloxona (Valdés-Tovar 2007).

Los efectos que se observaron en las ratas expuestas a la luz constante se pueden asociar a una alteración en la función de los osciladores centrales y periféricos, así como a la falta del ciclo luz-oscuridad como tal. En este sentido, Marpegan y colaboradores (2009) encontraron que la variación diurna en la mortalidad inducida por lipopolisacárido (LPS) y en el tiempo de supervivencia sólo se presentó en animales que fueron expuestos a un ciclo luz-oscuridad, mientras que en condiciones de oscuridad constante, los animales mostraron una mortalidad incrementada que fue independiente del tiempo de administración del reto con LPS. Con base en esta evidencia, estos autores proponen que la exposición a un ciclo de luz-oscuridad representa un beneficio al momento de enfrentar un reto inmunológico. En este sentido, nuestros resultados indican que sólo 5 ciclos de luz-oscuridad después de una exposición a LL durante 30 días son suficientes para restablecer el contenido de MEnk en los macrófagos y la secreción de IL-2 a partir de esplenocitos estimulados con GRC, hasta niveles semejantes a los encontrados en animales expuestos a LD.

El restablecimiento del ciclo luz-oscuridad no sólo impacta en la capacidad de respuesta inmunológica sino que también se ha demostrado que contrarresta las alteraciones metabólicas inducidas por la presencia de luz tenue durante la noche (Fonken et al. 2013b). Dada la estrecha relación que existe entre las enfermedades metabólicas y un estado de inflamación crónica, y la alta prevalencia actual de estos padecimientos así como de trastornos conductuales que también están asociados (Tapia-Osorio et al. 2013), el tomar medidas para contrarrestar la contaminación por luz durante la noche (higiene de la luz) resulta un asunto de salud pública. En el ámbito de la investigación básica que nos ocupa, consideramos que se requieren más estudios que permitan elucidar los mecanismos precisos que subyacen a los efectos de la exposición a regímenes de luz alterados sobre la inmunomodulación mediada por encefalinas.

## 8. Conclusiones

La evidencia indica que la exposición de las ratas a la luz constante, que implica la supresión de la síntesis nocturna de melatonina y la desorganización del ritmo circádico de actividad general, abate las oscilaciones diarias y la magnitud del contenido esplénico de MENk e inhibe su síntesis *de novo* en los macrófagos esplénicos CD169<sup>(+)</sup>. Además, esta condición medioambiental induce una deficiencia en la respuesta inmune primaria que podría ser debida a la participación subóptima de los macrófagos en los eventos tempranos de la respuesta adaptativa, que son modulados por las encefalinas. Los datos indican que la falta del ciclo luz-oscuridad afecta la biosíntesis de inmunomoduladores tales como los MECPs derivados de los macrófagos en detrimento del resultado final de la respuesta inmune. El desarrollo de estrategias para contrarrestar estos cambios ambientales, tales como la implementación de hábitos de higiene de la luz en la población, debería convertirse en un asunto de salud pública para la prevención de enfermedades asociadas con la desregulación del sistema inmune.



**Figura 8.1** La luz constante abate la síntesis de MENk en macrófagos esplénicos, su contenido intracelular y la presencia de gránulos que la contienen. También reduce su contenido tisular en el bazo durante las 24 h del día. Dado que la MENk es un modulador de la fisiología de los macrófagos y de la activación de los linfocitos, su disminución puede contribuir a la deficiencia de la respuesta inmune humoral primaria que se observa en esta condición medioambiental. El restablecimiento del ciclo luz-oscuridad revierte los efectos de la luz constante.

## 9. Literatura citada

- Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S (2012a) Activation of T Lymphocytes. En *Cellular and Molecular Immunology*, pp 203-224, Elsevier Saunders, USA.
- Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S (2012b) B Cell Activation and Antibody Production. En *Cellular and Molecular Immunology*, pp 243-268, Elsevier Saunders, USA.
- Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S (2012c) Effector Mechanisms of Cell-Mediated Immunity. En *Cellular and Molecular Immunology*, pp 225-242, Elsevier Saunders, USA.
- Abbas AK, Lichtman AHH and Pillai S (2012) *Cellular and Molecular Immunology*, Elsevier Saunders, USA.
- Aguilar R, Carmona V and Fanjul ML (2008) Los ritmos circadianos. En *Biología funcional de los animales Vol 2 Una neurofisiología comparada*, ML Fanjul and M Hiriart, eds, pp 327-352, Siglo XXI, México, D.F.
- Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E and Watson S (1998) Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend* 51:127-140.
- Amaral FG, Castrucci AM, Cipolla-Neto J, Poletini MO, Mendez N, Richter HG and Sellix MT (2014) Environmental control of biological rhythms: effects on development, fertility and metabolism. *J Neuroendocrinol* 26:603-612.
- Anisimov VN, Vinogradova IA, Panchenko AV, Popovich IG and Zabezhinski MA (2012) Light-at-night-induced circadian disruption, cancer and aging. *Curr Aging Sci* 5:170-177.
- Asai M and Gutiérrez R (1994) Neurobiología de los péptidos opioides. *Salud Mental Vol: 17 ( 2 )*: 30 - 43 , Junio , 1994 17:30-43
- Asai M, Mayagoitia L, Garcia D, Matamoros-Trejo G, Valdes-Tovar M and Leff P (2007) Rat brain opioid peptides-circadian rhythm is under control of melatonin. *Neuropeptides* 41:389-397.
- Asai M, Valdés-Tovar M, Matamoros-Trejo G and García D (2010) Melatonin induces enkephalins synthesis and release in the rat brain. *Salud Mental* 33:123-131.
- Asai M, Zubieta M, Matamoros-Trejo G, Linares G and Agustin P (1998) Diurnal variations of opioid peptides and synenkephalin in vitro release in the amygdala of kindled rats. *Neuropeptides* 32:293-299.
- Aschoff J (1981) Free running and entrained circadian rhythms. En *Handbook of Behavioral Neurology*, J Aschoff, ed, pp 81-93, Plenum Press, New York, USA.
- Backer R, Schwandt T, Greuter M, Oosting M, Jungerkes F, Tuting T, Boon L, O'Toole T, Kraal G, Limmer A and den Haan JM (2010) Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:216-221.
- Bedrosian TA, Aubrecht TG, Kaugars KE, Weil ZM and Nelson RJ (2013a) Artificial light at night alters delayed-type hypersensitivity reaction in response to acute stress in Siberian hamsters. *Brain Behav Immun*.
- Bedrosian TA, Fonken LK, Walton JC and Nelson RJ (2011) Chronic exposure to dim light at night suppresses immune responses in Siberian hamsters. *Biol Lett* 7:468-471.

- Bedrosian TA and Nelson RJ (2013) Influence of the modern light environment on mood. *Mol Psychiatry* 18:751-757.
- Bedrosian TA, Weil ZM and Nelson RJ (2013b) Chronic dim light at night provokes reversible depression-like phenotype: possible role for TNF. *Mol Psychiatry* 18:930-936.
- Beers C, Honey K, Fink S, Forbush K and Rudensky A (2003) Differential regulation of cathepsin S and cathepsin L in interferon gamma-treated macrophages. *J Exp Med* 197:169-179.
- Behar OZ, Ovadia H, Polakiewicz RD, Abramsky O and Rosen H (1991) Regulation of proenkephalin A messenger ribonucleic acid levels in normal B lymphocytes: specific inhibition by glucocorticoid hormones and superinduction by cycloheximide. *Endocrinology* 129:649-655.
- Berson DM, Dunn FA and Takao M (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295:1070-1073.
- Blask DE, Dauchy RT, Brainard GC and Hanifin JP (2009) Circadian stage-dependent inhibition of human breast cancer metabolism and growth by the nocturnal melatonin signal: consequences of its disruption by light at night in rats and women. *Integr Cancer Ther* 8:347-353.
- Bodnar RJ (2012) Endogenous opiates and behavior: 2011. *Peptides* 38:463-522.
- Boyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97:77-89.
- Cambras T, Castejon L and Diez-Noguera A (2011) Social interaction and sex differences influence rat temperature circadian rhythm under LD cycles and constant light. *Physiol Behav* 103:365-371.
- Cambras T, Castejon L and Diez-Noguera A (2012) Social interaction with a rhythmic rat enhances the circadian pattern of the motor activity and temperature of LL-induced arrhythmic rats. *Physiol Behav* 105:835-840.
- Cardinali DP (1981) Melatonin. I A mammalian pineal hormone. *Endocr Rev* 2:327-346.
- Cardinali DP, Esquifino AI, Srinivasan V and Pandi-Perumal SR (2008) Melatonin and the immune system in aging. *Neuroimmunomodulation* 15:272-278.
- Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sanchez N, Rodriguez-Rodriguez A and Guerrero JM (2013) Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci* 14:8638-8683.
- Cassetta L, Cassol E and Poli G (2011) Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal* 11:2391-2402.
- Chen W, Liu J, Meng J, Lu C, Li X, Wang E and Shan F (2012) Macrophage polarization induced by neuropeptide methionine enkephalin (MENK) promotes tumoricidal responses. *Cancer Immunol Immunother* 61:1755-1768.
- Cinzano P, Falchi F and Elvidge CD (2001) The first World Atlas of the artificial night sky brightness. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* 328:689-707.
- Claustrat B, Valatx JL, Harthe C and Brun J (2008) Effect of constant light on prolactin and corticosterone rhythms evaluated using a noninvasive urine sampling protocol in the rat. *Horm Metab Res* 40:398-403.
- Coomans CP, van den Berg SA, Houben T, van Klinken JB, van den Berg R, Pronk AC, Havekes LM, Romijn JA, van Dijk KW, Biermasz NR and Meijer JH (2013) Detrimental effects of constant light



exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity. *FASEB J* 27:1721-1732.

- Das KP, McMillian MK, Bing G and Hong JS (1995) Modulatory effects of [Met5]-enkephalin on interleukin-1 beta secretion from microglia in mixed brain cell cultures. *J Neuroimmunol* 62:9-17.
- Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE and Taylor PR (2013) Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14:986-995.
- den Haan JM and Kraal G (2012) Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J Innate Immun* 4:437-445.
- Erren TC and Reiter RJ (2009) Defining chronodisruption. *J Pineal Res* 46:245-247.
- Escobar C, Salgado-Delgado R, Gonzalez-Guerra E, Tapia Osorio A, Angeles-Castellanos M and Buijs RM (2011) Circadian disruption leads to loss of homeostasis and disease. *Sleep Disord* 2011:964510.
- Fischer-Colbrie R and Frischenschlager I (1985) Immunological characterization of secretory proteins of chromaffin granules: chromogranins A, chromogranins B, and enkephalin-containing peptides. *J Neurochem* 44:1854-1861.
- Fleminger G, Ezra E, Kilpatrick DL and Udenfriend S (1983) Processing of enkephalin-containing peptides in isolated bovine adrenal chromaffin granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:6418-6421.
- Fonken LK, Lieberman RA, Weil ZM and Nelson RJ (2013a) Dim light at night exaggerates weight gain and inflammation associated with a high-fat diet in male mice. *Endocrinology* 154:3817-3825.
- Fonken LK, Weil ZM and Nelson RJ (2013b) Dark nights reverse metabolic disruption caused by dim light at night. *Obesity (Silver Spring)* 21:1159-1164.
- Foris G, Medgyesi GA and Hauck M (1986) Bidirectional effect of met-enkephalin on macrophage effector functions. *Mol Cell Biochem* 69:127-137.
- Gil-Lozano M, Mingomataj EL, Wu WK, Ridout SA and Brubaker PL (2014) Circadian secretion of the intestinal hormone, glucagon-like peptide-1, by the rodent L-cell. *Diabetes*.
- Gupta BB, Spessert R and Vollrath L (2005) Molecular components and mechanism of adrenergic signal transduction in mammalian pineal gland: regulation of melatonin synthesis. *Indian J Exp Biol* 43:115-149.
- Hagi K, Uno K, Inaba K and Muramatsu S (1994) Augmenting effect of opioid peptides on murine macrophage activation. *J Neuroimmunol* 50:71-76.
- Hedin KE, Bell MP, Kalli KR, Huntoon CJ, Sharp BM and McKean DJ (1997) Delta-opioid receptors expressed by Jurkat T cells enhance IL-2 secretion by increasing AP-1 complexes and activity of the NF-AT/AP-1-binding promoter element. *J Immunol* 159:5431-5440.
- Hook V, Yasothornsrikul S, Greenbaum D, Medzihradzsky KF, Troutner K, Toneff T, Bunday R, Logrinova A, Reinheckel T, Peters C and Bogoy M (2004) Cathepsin L and Arg/Lys aminopeptidase: a distinct prohormone processing pathway for the biosynthesis of peptide neurotransmitters and hormones. *Biol Chem* 385:473-480.
- Hook VY, Schiller MR, Azaryan AV and Tezapsidis N (1996) Proenkephalin-processing enzymes in chromaffin granules: model for neuropeptide biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci* 780:121-133.
- House RV, Thomas PT and Bhargava HN (1996) A comparative study of immunomodulation produced by in vitro exposure to delta opioid receptor agonist peptides. *Peptides* 17:75-81.

- Hriscu M, Saulea G, Ostriceanu S and Baciu I (2002) Circadian phagocytic activity in rats under light-dark and constant light regimens. *Rom J Physiol* 39-40:17-26.
- Hucklebridge FH, Hudspith BN, Lydyard PM and Brostoff J (1990) Stimulation of human peripheral lymphocytes by methionine enkephalin and delta-selective opioid analogues. *Immunopharmacology* 19:87-91.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA and Morris HR (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258:577-580.
- Hulen D, Baron A, Salisbury J and Clarke M (1991) Production and specificity of monoclonal antibodies against calmodulin from *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil Cytoskeleton* 18:113-122.
- Hwang SR, O'Neill A, Bark S, Foulon T and Hook V (2007) Secretory vesicle aminopeptidase B related to neuropeptide processing: molecular identification and subcellular localization to enkephalin- and NPY-containing chromaffin granules. *J Neurochem* 100:1340-1350.
- Jasser SA, Blask DE and Brainard GC (2006) Light during darkness and cancer: relationships in circadian photoreception and tumor biology. *Cancer Causes Control* 17:515-523.
- Kamphuis S, Eriksson F, Kavelaars A, Zijlstra J, van de Pol M, Kuis W and Heijnen CJ (1998) Role of endogenous pro-enkephalin A-derived peptides in human T cell proliferation and monocyte IL-6 production. *J Neuroimmunol* 84:53-60.
- Klein DC and Berg GR (1970) Pineal gland: stimulation of melatonin production by norepinephrine involves cyclic AMP-mediated stimulation of N-acetyltransferase. *Adv Biochem Psychopharmacol* 3:241-263.
- Kowalski J (1998a) Augmenting effect of opioids on nitrite production by stimulated murine macrophages. *Neuropeptides* 32:287-291.
- Kowalski J (1998b) Immunomodulatory action of class mu-, delta- and kappa-opioid receptor agonists in mice. *Neuropeptides* 32:301-306.
- Kowalski J, Gabryel B, Labuzek K and Herman ZS (2002) Methionine-enkephalin and leucine-enkephalin increase interleukin-1 beta release in mixed glia cultures. *Neuropeptides* 36:401-406.
- Kowalski J, Makowiecka K, Belowski D and Herman ZS (2000) Augmenting effect of methionine-enkephalin on interleukin-6 production by cytokine-stimulated murine macrophages. *Neuropeptides* 34:187-192.
- Krajnik M, Schafer M, Sobanski P, Kowalewski J, Bloch-Boguslawska E, Zylicz Z and Mousa SA (2010) Enkephalin, its precursor, processing enzymes, and receptor as part of a local opioid network throughout the respiratory system of lung cancer patients. *Hum Pathol* 41:632-642.
- Kuis W, Villiger PM, Leser HG and Lotz M (1991) Differential processing of proenkephalin-A by human peripheral blood monocytes and T lymphocytes. *J Clin Invest* 88:817-824.
- Lax P, Zamora S and Madrid JA (1998) Coupling effect of locomotor activity on the rat's circadian system. *Am J Physiol* 275:R580-587.
- Lax P, Zamora S and Madrid JA (1999) Food-entrained feeding and locomotor circadian rhythms in rats under different lighting conditions. *Chronobiol Int* 16:281-291.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH and Mori W (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society* 80:2587-2587.

- Li W, Chen W, Herberman RB, Plotnikoff NP, Youkilis G, Griffin N, Wang E, Lu C and Shan F (2014) Immunotherapy of cancer via mediation of cytotoxic T lymphocytes by methionine enkephalin (MENK). *Cancer Lett* 344:212-222.
- Li W, Meng J, Li X, Hua H, Yiming M, Wang Q, Wang E and Shan F (2012) Methionine enkephalin (MENK) improved the functions of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) loaded with antigen. *Hum Vaccin Immunother* 8:1236-1242.
- Lichtnekert J, Kawakami T, Parks WC and Duffield JS (2013) Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves. *Curr Opin Pharmacol*.
- Liu J, Chen W, Meng J, Lu C, Wang E and Shan F (2012) Induction on differentiation and modulation of bone marrow progenitor of dendritic cell by methionine enkephalin (MENK). *Cancer Immunol Immunother* 61:1699-1711.
- Loh YP, Maldonado A, Zhang C, Tam WH and Cawley N (2002) Mechanism of sorting proopiomelanocortin and proenkephalin to the regulated secretory pathway of neuroendocrine cells. *Ann N Y Acad Sci* 971:416-425.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Maestroni GJ and Conti A (1992) The pineal-immuno-opioid network. Mechanisms and significance. *Ann N Y Acad Sci* 650:56-59.
- Maestroni GJ, Conti A and Pierpaoli W (1986) Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J Neuroimmunol* 13:19-30.
- Maestroni GJ, Conti A and Pierpaoli W (1987) Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin Exp Immunol* 68:384-391.
- Maestroni GJ, Conti A and Pierpaoli W (1988) Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology* 63:465-469.
- Mao L, Dauchy RT, Blask DE, Slakey LM, Xiang S, Yuan L, Dauchy EM, Shan B, Brainard GC, Hanifin JP, Frasch T, Duplessis TT and Hill SM (2012) Circadian gating of epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells via melatonin-regulation of GSK3beta. *Mol Endocrinol* 26:1808-1820.
- Marotti T, Balog T, Mazuran R and Rocic B (1998) The role of cytokines in MET-enkephalin-modulated nitric oxide release. *Neuropeptides* 32:57-62.
- Marotti T, Burek B, Rabatic S, Balog T and Hrsak I (1994) Modulation of lipopolysaccharide-induced production of cytokines by methionine-enkephalin. *Immunol Lett* 40:43-47.
- Marpegan L, Leone MJ, Katz ME, Sobrero PM, Bekinstein TA and Golombek DA (2009) Diurnal variation in endotoxin-induced mortality in mice: correlation with proinflammatory factors. *Chronobiol Int* 26:1430-1442.
- Martin J, Prystowsky MB and Angeletti RH (1987) Preproenkephalin mRNA in T-cells, macrophages, and mast cells. *J Neurosci Res* 18:82-87.
- Martinez-Pomares L and Gordon S (2007) Antigen presentation the macrophage way. *Cell* 131:641-643.

- McGaha TL, Chen Y, Ravishankar B, van Rooijen N and Karlsson MC (2011) Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen. *Blood* 117:5403-5412.
- McLaughlin PJ and Zagon IS (2012) The opioid growth factor-opioid growth factor receptor axis: homeostatic regulator of cell proliferation and its implications for health and disease. *Biochem Pharmacol* 84:746-755.
- Mendez N, Abarzua-Catalan L, Vilches N, Galdames HA, Spichiger C, Richter HG, Valenzuela GJ, Seron-Ferre M and Torres-Farfan C (2012) Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. *PLoS One* 7:e42713.
- Mond JJ and Brunswick M (2000) In vitro antibody production. En *Current Protocols in Immunology*.
- Mosser DM and Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969.
- Mousa SA, Shakibaei M, Sitte N, Schafer M and Stein C (2004) Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain. *Endocrinology* 145:1331-1341.
- Murray PJ and Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11:723-737.
- Nguyen K and Miller BC (2002) CD28 costimulation induces delta opioid receptor expression during anti-CD3 activation of T cells. *J Immunol* 168:4440-4445.
- Nikbakht N, Shen S and Manser T (2013) Cutting edge: Macrophages are required for localization of antigen-activated B cells to the follicular perimeter and the subsequent germinal center response. *J Immunol* 190:4923-4927.
- Novakova M, Polidarova L, Sladek M and Sumova A (2011) Restricted feeding regime affects clock gene expression profiles in the suprachiasmatic nucleus of rats exposed to constant light. *Neuroscience* 197:65-71.
- O'Neill AS, van den Berg TK and Mullen GE (2013) Sialoadhesin - a macrophage-restricted marker of immunoregulation and inflammation. *Immunology* 138:198-207.
- Padros MR, Vindrola O, Zunszain P, Fainboin L, Finkielman S and Nahmod VE (1989) Mitogenic activation of the human lymphocytes induce the release of proenkephalin derived peptides. *Life Sci* 45:1805-1811.
- Patey G, De La Baume S, Schwartz JC, Gros C, Roques B, Fournie-Zaluski MC and Soroca-Lucas E (1981) Selective protection of methionine enkephalin released from brain slices by enkephalinase inhibition. *Science* 212:1153-1155.
- Pert CB and Snyder SH (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179:1011-1014.
- Pittendrigh CS (1981) Circadian systems: General perspective. En *Handbook of Behavioral Neurology*, J Aschoff, ed, pp 57-80, Plenum Press, New Yoek, USA.
- Pittendrigh CS (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* 55:16-54.
- Pitzurra L, Rossetto O, Chimienti AR, Blasi E and Bistoni F (1996) Tetanus toxin-sensitive VAMP-related proteins are present in murine macrophages. *Cell Immunol* 169:113-116.

- Radogna F, Diederich M and Ghibelli L (2010) Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. En *Biochem Pharmacol*, pp 1844-1852, 2010 Elsevier Inc, England.
- Radulovic J, Dimitrijevic M, Laban O, Stanojevic S, Vasiljevic T, Kovacevic-Jovanovic V and Markovic BM (1995) Effect of Met-enkephalin and opioid antagonists on rat macrophages. *Peptides* 16:1209-1213.
- Reiter RJ (1993) The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49:654-664.
- Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Erren TC, Piekarski C, Tamura H and Manchester LC (2007) Light at night, chronodisruption, melatonin suppression, and cancer risk: a review. *Crit Rev Oncog* 13:303-328.
- Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A and Ma S (2012) Obesity and metabolic syndrome: association with chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin suppression. *Ann Med* 44:564-577.
- Rosen H, Behar O, Abramsky O and Ovadia H (1989) Regulated expression of proenkephalin A in normal lymphocytes. *J Immunol* 143:3703-3707.
- Rouille Y, Duguay SJ, Lund K, Furuta M, Gong Q, Lipkind G, Oliva AA, Jr., Chan SJ and Steiner DF (1995) Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Front Neuroendocrinol* 16:322-361.
- Salzet M and Tasiemski A (2001) Involvement of pro-enkephalin-derived peptides in immunity. *Dev Comp Immunol* 25:177-185.
- Shan F, Xia Y, Wang N, Meng J, Lu C, Meng Y and Plotnikoff NP (2011) Functional modulation of the pathway between dendritic cells (DCs) and CD4+T cells by the neuropeptide: methionine enkephalin (MENK). *Peptides* 32:929-937.
- Sharp BM (2003) Opioid receptor expression and intracellular signaling by cells involved in host defense and immunity. *Adv Exp Med Biol* 521:98-105.
- Sharp BM (2006) Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav Immun* 20:9-14.
- Sharp BM, Li MD, Matta SG, McAllen K and Shahabi NA (2000) Expression of delta opioid receptors and transcripts by splenic T cells. *Ann N Y Acad Sci* 917:764-770.
- Sharp BM, McKean DJ, McAllen K and Shahabi NA (1998) Signaling through delta opioid receptors on murine splenic T cells and stably transfected Jurkat cells. *Ann N Y Acad Sci* 840:420-424.
- Shukla A, Berglund L, Nielsen LP, Nielsen S, Hoffmann HJ and Dahl R (2000) Regulated exocytosis in immune function: are SNARE-proteins involved? *Respir Med* 94:10-17.
- Shurlygina AV, Mitsuhrina SV, Verbitskaja LV, Belkin AD, Shanturova TV, Bitchaeva MV, Kovshik IG and Trufakin VA (2010) Structure of nuclear chromatin in cells of lymphoid organs and blood from mice maintained under abnormal light-dark cycle and treated with benz(a)pyrene. *Bull Exp Biol Med* 149:29-32.
- Simon EJ, Hiller JM and Edelman I (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:1947-1949.
- Singh PP and Singh S (2001) Protection of mice from malaria after co-administration of recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and methionine-enkephalin. *Eur Cytokine Netw* 12:528-536.

- Singh VK, Bajpai K, Narayan P, Yadav VS, Dhawan VC, Haq W, Mathur KB and Agarwal SS (1999) Delta-opioid receptor antagonist inhibits immunomodulation by Met-enkephalin analogs. *Neuroimmunomodulation* 6:355-360.
- Stephan FK (2002) The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms* 17:284-292.
- Sudo M, Sasahara K, Moriya T, Akiyama M, Hamada T and Shibata S (2003) Constant light housing attenuates circadian rhythms of mPer2 mRNA and mPER2 protein expression in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Neuroscience* 121:493-499.
- Tapia-Osorio A, Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M and Escobar C (2013) Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behav Brain Res* 252:1-9.
- Terenius L (1973) Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 33:377-384.
- Terenius L and Wahlstrom A (1975) Search for an endogenous ligand for the opiate receptor. *Acta Physiol Scand* 94:74-81.
- Trufakin VA, Shurlygina AV, Michurina SV, Verbitskaja LV, Litvinenko GI, Kovshik IG, Panteleeva NG, Melnikova EV and Bitchaeva MV (2007) The influence of experimental desynchronization on the morphofunctional characteristics of mouse immune system. *Alaska Med* 49:169-176.
- Udenfriend S and Kilpatrick DL (1983) Biochemistry of the enkephalins and enkephalin-containing peptides. *Arch Biochem Biophys* 221:309-323.
- Valdes-Tovar M, Asai M and Matamoros-Trejo G (2003) Melatonin effect over the opioid peptides tissue content in the rat immune system. *Salud Mental* 26:46-56.
- Valdés-Tovar M (2007) Estudio de la relación bioquímica-funcional entre la melatonina y los péptidos opioides en el sistema inmune de la rata. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F.
- van Epps DE and Saland L (1984) Beta-endorphin and met-enkephalin stimulate human peripheral blood mononuclear cell chemotaxis. *J Immunol* 132:3046-3053.
- Vindrola O, Padros MR, Sterin-Prync A, Ase A, Finkielman S and Nahmod V (1990) Proenkephalin system in human polymorphonuclear cells. Production and release of a novel 1.0-kD peptide derived from synenkephalin. *J Clin Invest* 86:531-537.
- Vinogradova IA, Anisimov VN, Bukalev AV, Ilyukha VA, Khizhkin EA, Lotosh TA, Semenchenko AV and Zabezhinski MA (2010) Circadian disruption induced by light-at-night accelerates aging and promotes tumorigenesis in young but not in old rats. *Aging (Albany NY)* 2:82-92.
- Vujic V, Stanojevic S and Dimitrijevic M (2004) Methionine-enkephalin stimulates hydrogen peroxide and nitric oxide production in rat peritoneal macrophages: interaction of mu, delta and kappa opioid receptors. *Neuroimmunomodulation* 11:392-403.
- Vujic-Redzic V, Dimitrijevic M, Stanojevic S, Kovacevic-Jovanovic V, Miletic T and Radulovi J (2000) Peripheral effects of methionine-enkephalin on inflammatory reactions and behavior in the rat. *Neuroimmunomodulation* 8:70-77.
- Wurtman RJ (1975) The effects of light on the human body. *Sci Am* 233:69-77.

- Yamanaka Y, Honma S and Honma K (2013) Daily exposure to a running wheel entrains circadian rhythms in mice in parallel with development of an increase in spontaneous movement prior to running-wheel access. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305:R1367-1375.
- Yang SX and Li XY (1989) Enhancement of interleukin-1 production in mouse peritoneal macrophages by methionine-enkephalin. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 10:266-270.
- Yang SX and Li XY (1992) Influence of methionine-enkephalin on interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 13:131-136.
- Yasothornsrikul S, Greenbaum D, Medzihradzky KF, Toneff T, Bunday R, Miller R, Schilling B, Petermann I, Dehnert J, Logvinova A, Goldsmith P, Neveu JM, Lane WS, Gibson B, Reinheckel T, Peters C, Bogyo M and Hook V (2003) Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9590-9595.
- Young MW (2000) The tick-tock of the biological clock. *Sci Am* 282:64-71.
- Zhang B and Sannajust F (2000) Diurnal rhythms of blood pressure, heart rate, and locomotor activity in adult and old male Wistar rats. *Physiol Behav* 70:375-380.
- Zurawski G, Benedik M, Kamb BJ, Abrams JS, Zurawski SM and Lee FD (1986) Activation of mouse T-helper cells induces abundant preproenkephalin mRNA synthesis. *Science* 232:772-775.

# Apéndice 1

## Obtención de extractos tisulares de bazo

Inmediatamente después de la disección, cada bazo se colocó en un tubo con 5 mL de ácido acético 2 M. Los tubos se colocaron en un baño con agua en ebullición durante 15 minutos y posteriormente en un baño de hielo. Se utilizó un sistema de émbolo para obtener un homogenado del tejido. Se centrifugó a 20,000 rpm durante 1 h a 4°C y se recuperó el sobrenadante (extracto proteico).

## Radioinmunoensayo para la determinación de Met-Encefalina (MENk)

El radioinmunoensayo es una técnica analítica que se basa en la especificidad y la sensibilidad de la reacción antígeno-anticuerpo. En esta técnica se establece una competencia entre dos antígenos por los sitios de reconocimiento de una cantidad constante de anticuerpos. Uno de estos antígenos está marcado radiactivamente y se le llama trazador. En este caso particular el ensayo se realizó en fase líquida y los antígenos en competencia fueron: la MENk pura marcada con  $^{125}\text{I}$  y la MENk contenida en los extractos de bazo de rata. El anticuerpo que se utilizó es un antisuero policlonal específico para el sulfóxido de MENk [MENk-(o)] que fue preparado en conejo por el Dr. Asai y colaboradores. Las propiedades de reactividad cruzada de este antisuero se reportaron previamente (Asai et al. 1998), y son las siguientes:

Péptido	% Reactividad
Met-encefalina-(o)	100.00
Met-encefalina	2.90
Leu-encefalina	0.01
Met-encefalina <sup>5</sup> -Arg <sup>6</sup>	0.76
Leu-encefalina <sup>5</sup> -Arg <sup>6</sup>	<0.01
Met-encefalina <sup>5</sup> -Arg <sup>6</sup> -Phe <sup>7</sup>	<0.01



<b>Péptido</b>	<b>% Reactividad</b>
Met-enkefalina <sup>5</sup> -Arg <sup>6</sup> -Gly <sup>7</sup> -Leu <sup>8</sup>	<0.01
Dinorfina 1-8	<0.01
$\alpha$ -endorfina	<0.01
$\beta$ -endorfina	<0.01
$\gamma$ -endorfina	<0.01

La metodología del radioinmunoensayo se compone de tres partes principales que son:

- 1) El marcaje del péptido puro que se utiliza como sustancia patrón y la purificación del péptido monoyodado mediante cromatografía en capa fina y autorradiografía.
- 2) La elaboración de la curva patrón con concentraciones conocidas del péptido puro.
- 3) El análisis de las muestras problema.

### **Reacción de yodación**

- Para la yodación de la MENk (Peninsula Laboratories) con el radioisótopo <sup>125</sup>I (Amersham Pharmacia Biotech), se tomaron 2  $\mu$ g del péptido en un microtubo de plástico y se añadieron 200  $\mu$ Ci de <sup>125</sup>I. Se agitó brevemente.
- Se añadieron 5  $\mu$ L de una solución de Cloramina T (2 mg/mL). Se agitó durante 30 segundos exactos. Para detener la reacción se agregaron 10  $\mu$ L de la solución de metabisulfito de sodio (4 mg/mL) y 60  $\mu$ L de HCl 0.1 M.

### **Cromatografía en capa fina**

- Se utilizaron placas de aluminio recubiertas con silica gel 60 F<sub>254</sub>. Dimensiones 20 x 20 cm, espesor de capa 0.2 mm.
- Se marcaron con lápiz cinco carriles de 1 cm y la línea de aplicación a 2 cm del borde.
- Se aplicó el péptido marcado en los carriles correspondientes, utilizando una micropipeta o una jeringa Hamilton, sobre la línea de aplicación.

- Una vez que la muestra se hubo adsorbido completamente, se colocó la placa dentro de una cuba previamente nivelada que contenía el siguiente sistema de disolventes como fase móvil: Butanol : Ácido acético : H<sub>2</sub>O 4:1:1
- Cuando la fase móvil sobrepasó los 12 cm a partir de la línea de aplicación, se sacó la cromatoplaque de la cuba, se marcó con un lápiz el frente del disolvente y se dejó secar.

### **Autorradiografía**

- Se colocó la cromatoplaque y sobre ella una película Kodak TMAX-100 en una caja cerrada diseñada para este fin. Se trabajó en oscuridad.
- Se expuso la película a la radiación, durante 15 a 30 minutos.
- Se retiró la película y se reveló. Para ello se sumergió en una charola que contenía revelador Kodak (Dektol developer) durante 3 minutos, se lavó en una charola con agua durante 1 minuto e inmediatamente después se sumergió en una charola que contenía fijador Kodak (Rapid fixer) durante 3 minutos. Finalmente se volvió a lavar con agua durante 1 minuto. Se secó al aire.
- Con el fin de calcular el factor de retención (R.f.) del péptido radiactivo, se colocó la película fotográfica sobre la cromatoplaque y se indicó con un marcador la línea de aplicación y el frente del disolvente.
- Se calculó el factor de retención (R.f.), dividiendo la distancia recorrida por cada muestra desde el punto de aplicación entre la distancia del punto de aplicación al frente del disolvente. El R.f. calculado se comparó con el reportado para MENk que es de 0.33.

### **Extracción del péptido marcado**

- Se marcó sobre la cromatoplaque el sitio en el que se encontraba el péptido monoyodado, de acuerdo al R.f. obtenido en la autorradiografía.
- Se recortó la cromatoplaque con tijeras y se colocó en un tubo de ensayo de plástico.
- Se agregaron 4 mL de una disolución metanol:agua 1:1 y se agitó vigorosamente durante 20 minutos.
- Se sometió a centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos.

- Se recuperó el sobrenadante en otro tubo de ensayo de plástico debidamente rotulado.
- Se repitió la extracción.
- El contenido del tubo rotulado se concentró por evaporación a sequedad y se resuspendió en 1 mL de agua destilada.
- Se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  del péptido marcado y se llevó al contador de radiación gamma para determinar el número de cuentas por minuto (cpm).

### Disoluciones de trabajo para el ensayo

- Disolución de Fosfatos 0.05 M pH=7.4

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2.76 g/L

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.26 g/L

$\text{NaCl}$  9.00 g/L

$\text{Na}_3\text{N}$  0.20 g/L

Gelatina 1.00 g/L

La gelatina se disuelve en agua destilada caliente, se deja enfriar y se agrega a la disolución después de haber ajustado el pH.

- Carbón activado pH=7.4

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2.76 g/L

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.26 g/L

$\text{NaCl}$  9.00 g/L

$\text{Na}_3\text{N}$  0.20 g/L

Dextran 1.25 g/L

Carbón activado 12.5 g/L

El carbón activado se agrega después de haber ajustado el pH. Se agita por dos horas.

### Oxidación de la MENk pura y de las muestras problema

Dado que el antisuero reconoce específicamente al sulfóxido de MENk, el péptido puro que se utilizó para la curva patrón se oxidó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% (concentración final) durante toda la noche a temperatura ambiente. De manera similar, los extractos tisulares de bazo se oxidaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.6% (concentración final) durante toda la noche a temperatura ambiente.

### Curva patrón

Se prepararon 11 diluciones seriales 1:2 a partir de una disolución de concentración conocida de MENk de tal manera en cada tubo hubiera la cantidad de péptido que indica la siguiente tabla:

<b>Met-Encefalina</b>	
<b>ng</b>	<b>pmol</b>
20	34.9
10	17.45
5	8.72
2.5	4.36
1.25	2.18
0.62	1.09
0.31	0.54
0.15	0.27
0.07	0.13
0.03	0.06
0.01	0.03

### Procedimiento para el RIA

- a. Se utilizaron tubos de vidrio numerados. Se trabajó cada tubo por triplicado.
- b. Se preparó una dilución del péptido radiactivo con disolución amortiguadora de fosfatos 0.05 M de tal manera que cada 100  $\mu\text{L}$  contuvieran aproximadamente 10,000 cpm (cuentas por minuto). Para determinar la intensidad de radiación en cpm, se utilizó el contador de radiación gamma Isomedic 4-600 (ICN).
- c. Se preparó una dilución del antisuero de tal manera que el porcentaje de unión total fuera de 25 a 30%.
- d. A cada tubo se agregaron los reactivos en el siguiente orden de izquierda a derecha:

Tubos	Disolución de Fosfatos 0.05 M		$^{125}\text{I}$ – MEnk	Antisuero	Carbón activado*
100%	350 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> O	100 $\mu\text{L}$	-	-
Unión inespecífica	350 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> O	100 $\mu\text{L}$	-	200 $\mu\text{L}$
Unión total	250 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> O	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
Curva patrón	250 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$ curva	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
Muestras	250 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$ muestra	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$

- e. Después de agregar el antisuero los tubos se agitaron suavemente y se incubaron a 4°C durante por lo menos 18 h.
- f. \*El carbón activado se agitó durante una hora y se agregó a los tubos correspondientes, después del periodo de incubación.
- g. Los tubos se agitaron suavemente y se sometieron a centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos.
- h. Se recuperó el sobrenadante por decantación.
- i. Los tubos se llevaron al contador de radiación gamma Isomedic 4/600 (ICN) para determinar las cuentas por minuto (cpm) en cada tubo.

- j. Se transformaron las cpm obtenidas a unidades de masa (pmol) mediante un programa de cómputo. En este programa se introduce la información relativa a la curva patrón y éste realiza los cálculos necesarios para interpolar los valores de las muestras, arrojando finalmente el contenido de inmunorreactividad (IR) en pmol/tubo.
- k. Tras determinar la cantidad de proteína en cada muestra, la IR-MEnk fue expresada como pmol del péptido por miligramo de proteína.

## **Apéndice 2: Artículo requisito**

ORIGINAL ARTICLE

# Constant light suppresses production of Met-enkephalin-containing peptides in cultured splenic macrophages and impairs primary immune response in rats

Marcela Valdés-Tovar<sup>1,2</sup>, Carolina Escobar<sup>3</sup>, Héctor Solís-Chagoyán<sup>1</sup>, Miguel Asai<sup>4</sup>, and Gloria Benítez-King<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Tlalpan, Distrito Federal, México, <sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Distrito Federal, México, <sup>3</sup>Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Distrito Federal, México, and <sup>4</sup>PPAyC, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Tlalpan, Distrito Federal, México

The light–dark cycle is an environmental factor that influences immune physiology, and so, variations of the photoperiod length result in altered immune responsiveness. Macrophage physiology comprises a spectrum of functions that goes from host defense to immune down-regulation, in addition to their homeostatic activities. Macrophages also play a key role in the transition from innate to adaptive immune responses. Met-enkephalin (MENk) has been recognized as a modulator of macrophage physiology acting in an autocrine or paracrine fashion to influence macrophage activation, phenotype polarization and production of cytokines that would enhance lymphocyte activation at early stages of an immune response. Previously it was shown that splenic MENk tissue content is reduced in rats exposed to constant light. In this work, we explored whether production of Met-enkephalin-containing peptides (MECPs) in cultured splenic macrophages is affected by exposure of rats to a constant light regime. In addition, we explored whether primary immune response was impaired under this condition. We found that in rats, 15 days in constant light was sufficient to disrupt their general activity rhythm. Splenic MENk content oscillations and levels were also blunted throughout a 24-h period in animals subjected to constant light. In agreement, *de novo* synthesis of MECPs evaluated through incorporation of <sup>35</sup>S-methionine was reduced in splenic macrophages from rats exposed to constant light. Moreover, MECPs immunocytochemistry showed a decrease in the intracellular content and lack of granule-like deposits in this condition. Furthermore, we found that primary T-dependent antibody response was compromised in rats exposed to constant light. In those animals, pharmacologic treatment with MENk increased IFN- $\gamma$ -secreting cells. Also, IL-2 secretion from antigen-stimulated splenocytes was reduced after incubation with naloxone, suggesting that immune-derived opioid peptides and stimulation of opioid receptors are involved in this process. Thus, the immune impairment observed from early stages of the response in constant light-subjected rats, could be associated with reduced production of macrophage-derived enkephalins, leading to a sub-optimal interaction between macrophages and lymphocytes in the spleen and the subsequent deficiency in antibody production.

**Keywords:** Constant light, endogenous opioid peptides, immunomodulation, melatonin

## INTRODUCTION

Physiological processes that follow circadian rhythms are synchronized by environmental cues, being the light–dark (LD) cycle one of the most important *zeitgebers*. Modern life in our 24-h society has imposed a challenge for human physiology, since exposure to unnatural LD cycles seems to be the rule rather than the exception. In this sense, there is evidence that most of the population in industrialized countries is exposed

to light at night (LAN) (Cinzano et al., 2001) which has been associated with disturbances in metabolism, behavior and immune responsiveness (Fonken et al., 2012, 2013; Fonken & Nelson, 2014). Different light regimes, including constant light exposure, have been proposed as experimental models to explore the detrimental effects of exposure to LAN. Evidence showed that chronic exposure to constant light increased spontaneous tumorigenesis and shortened life span in young

Submitted March 10, 2014, Returned for revision August 26, 2014, Accepted August 27, 2014

Corresponding: Gloria Benítez-King, Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, C.P. 14370, Distrito Federal, Mexico. Tel: (52 55) 4160-5097. E-mail: bekin@imp.edu.mx



rats (Vinogradova et al., 2010). This constant illumination condition also induced development of metabolic syndrome and increased chemical-induced carcinogenesis in rats (Anisimov et al., 2012). Both cancer and metabolic disorders involve an unbalance of immune functions. In this sense, Trufakin et al. found that exposure of mice to a constant light regime during two weeks induced a condition of internal desynchronization that decreased immune responsiveness and impaired animal resistance to a toxic chemical challenge, even at the molecular level (Shurlygina et al., 2010; Trufakin et al., 2007). It has also been proved that light pollution at night-time altered immune function in hamsters as a response to stress (Bedrosian et al., 2011, 2013).

Among the diversity of immunocompetent cells, macrophages participate in modulation of immune responses at different levels. They act as effector cells in terms of host defense, through phagocytosis of pathogens as well as infected or transformed cells, and by secretion of pro-inflammatory cytokines. Besides, as macrophages are strategically located within lymphoid organs, they interact with dendritic cells (DCs) to transfer antigens (Backer et al., 2010) and with lymphocytes to induce their activation (Martinez-Pomares & Gordon, 2007), playing a key role in the transition from innate to adaptive immunity. Macrophages may also secrete anti-inflammatory cytokines and, therefore, down-regulate immune responses. In addition, these cells participate in homeostatic functions as wound-healing and tissue-remodeling processes and in the maintenance of self-tolerance by the constant clearance of apoptotic and aged cells (den Haan & Kraal, 2012). To fulfill the complex spectrum of functions mentioned above, macrophages have developed plasticity to differentiate into several specialized functional phenotypes (Mosser & Edwards, 2008), depending on their anatomical localization, cell–cell interactions and biochemical mediators present at their extracellular milieu.

Macrophage functions are modulated by enkephalins (Salzet & Tasiemski, 2001), among other endogenous opioids. Proenkephalin-derived peptides are synthesized and released by different lineages of immune cells (Kavelaars & Heijnen, 2000; Padros et al., 1989; Vindrola et al., 1990), including monocytes-macrophages (Kuis et al., 1991; LaMendola et al., 1997). These peptides exert their actions in an autocrine or paracrine fashion, through their binding to opioid receptors at the cell membrane (Sharp, 2003). Met-enkephalin (MENk) has been proved to induce macrophage activation, phenotype polarization and phagocytosis, as well as production of reactive oxygen and nitrogen species and production of pro-inflammatory cytokines (Chen et al., 2012; Kowalski, 1997; Kowalski et al., 2000; Marotti et al., 1996; Vujic et al., 2004).

Previously, exposure to constant light was proved to reduce enkephalin tissue content and release from rat CNS structures (Asai et al., 2007). Similarly, lymphoid organs as thymus and spleen from rats exposed to a

light–light regime had reduced enkephalin tissue content (single-point measurement) (Valdes-Tovar et al., 2003). However, splenic cellular composition is heterogeneous and includes diverse immunocompetent cells. Since macrophages play an important role in host defense and could polarize the immune response toward different outcomes by their interactions with other immune cells, in this work, we explored whether the production of MENk-containing peptides (MECPs) in splenic macrophages is affected when rats are exposed to constant light, and whether this environmental condition could impair primary immune response.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Cell culture medium and supplements were purchased from GIBCO® Life Technologies (Carlsbad, CA); Ficoll-Paque® PLUS was obtained from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Mouse anti-rat CD169 monoclonal antibody was purchased from AbD Serotec (Kidlington, UK). Biotin- and Tetramethylrhodamineisothiocyanate (TRITC)-conjugated secondary antibodies were obtained from Jackson Immunoresearch (West Grove, PA). Anti-Met-enkephalin-sulfoxide [MENk-(o)] and anti-Met<sup>5</sup>-Enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> (MERF) polyclonal antisera were produced by Dr Asai and his colleagues and their cross-linking data were reported previously (Asai et al., 1998). Vesicle-associated membrane protein (VAMP)-1/2 monoclonal antibody (IgM) and fluorescein (FITC)-conjugated anti-mouse IgM were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). MENk was purchased from Peninsula-BACHEM (San Carlos, CA). ELISpot and ELISA kits were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN; EL502: Rat IL-2, EL585: Rat IFN- $\gamma$ , R2000: Rat IL-2 ELISA). Melatonin ELISA kit was obtained from IBL (Hamburg, Germany). Fresh sheep blood was purchased from CEPIPSA, UNAM (Mexico City, MEXICO). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich™ Corporate (St. Louis, MO) unless otherwise stated.

### Animals

Male Wistar rats (200–250 g) were housed in polypropylene cages with pellet food and water available *ad libitum*. Control group was exposed to a 12:12 h light–dark LD regime (lights on at 07:00 h). Experimental group was exposed to constant light (LL) during 15 days, with a light intensity of 50 lux. All national and institutional ethical regulations regarding animal handling were strictly followed. Our experimental protocol was conducted in conformity to international ethical standards (Portaluppi et al., 2010).

### General activity monitoring

Six rats were housed in individual acrylic cages and placed in a locker with controlled air supply and controlled temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), in a soundproof

monitoring room. Food and water were available *ad libitum* and bed shavings were changed every week. Lighting conditions were controlled for the locker, allowing it to have a baseline where rats were under a LD cycle during five days, with lights on at 07:00 h and lights off at 19:00 h. After this period, animals were exposed to LL during 15 days with an average light intensity of 75 lux at the level of the cage. General activity was registered with an automatic monitoring system as previously reported (Tapia-Osorio et al., 2013). Briefly, tilt switches were placed under the individual cages to detect general movements continuously. Data obtained from the sensors were collected with a digitized system and automatically stored in a computer for further analysis. Both the system for activity monitoring and the software for data analysis (PC SPAD9) were developed by the biomedical company Omniaalva SA de CV (Mexico City, MEXICO).

Double-plotted actograms were constructed for each animal representing the number of activity counts every 15 min for the LD baseline and the following LL condition. Also, periodograms were obtained with a  $\chi^2$  analysis for the five-day LD baseline and the last five days of LL exposure, in order to determine the daily period of each rat. As well, a mean activity profile ( $n=6$  rats) was obtained from the five-day LD baseline and the last five days of LL exposure.

#### Determination of splenic MENk content for a 24-h period

Rats subjected to either LD or LL regimes were sacrificed at 4 h-intervals starting at 09:00 h throughout a 24 h-period. Spleens were dissected and homogenized to obtain a tissue extract as previously reported (Valdes-Tovar et al., 2003). Splenic extracts were loaded into Amberlite XAD-2 (Rohm and Haas, Philadelphia, PA) columns for solid phase peptide extraction. Elution of the peptide fraction was carried out using absolute methanol. Samples were then lyophilized, resuspended in deionized water and oxidized with 0.6%  $H_2O_2$  for further MENk quantification. Radioimmunoassay for MENk was performed using an iodinated-MENk tracer and the MENk-(o) antiserum as reported previously (Asai et al., 1998). Each sample was assayed by triplicate. Protein content in the splenic peptide extracts was determined by Lowry's method. Results are expressed as pmol of IR-MENk/mg of protein.

#### Melatonin determination

Serum melatonin levels from LD- and LL-exposed rats were determined by ELISA, according to the manufacturer instructions. Trunk peripheral blood samples were obtained at 13:00 and 01:00 h and immediately protected from light. Serum was obtained by centrifugation and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until assay. Sacrifice of LD-rats during the dark phase was performed under red dim light.

#### Mononuclear splenocyte isolation and culture

All animals were sacrificed at 11:00 h. Splenic single-cell suspensions were obtained after mechanical disruption through a stainless steel grid (200 mesh). Mononuclear splenocytes were then isolated by centrifugation over Ficoll-Paque<sup>®</sup> Plus (Boyum, 1968) and finally cultured at  $2.5 \times 10^6$  cells/mL in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine and 1X GIBCO<sup>®</sup> Antibiotic-antimycotic. After six days of incubation at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  humidified atmosphere, all non-adherent cells were withdrawn and macrophages left in culture. In order to prevent enkephalinase activity (Patey et al., 1981), 0.1 mM Phe-Ala was added to the culture medium 4 h before cell fixation or cell lysis.

For induction of primary immune response *in vitro*, samples of  $5 \times 10^6$  mononuclear splenocytes were stimulated with 2% v/v sheep red blood cells (SRBC) and incubated with either 10 nM naloxone or 0.1 nM MENk for 72 h. Supernatants were collected and stored at  $-70^\circ\text{C}$  for subsequent IL-2 determination.

#### Immunofluorescence staining

For characterization of splenic macrophages, preparations were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA), and permeabilized with 0.1% Tween 20 in 0.01 M PBS pH 7.4. Blocking with 2% BSA-PBS was followed by overnight incubation with mouse anti-rat CD169 (1:150) in 1% BSA-0.05% Tween 20-PBS, at  $4^\circ\text{C}$ . After extensive washing, cells were incubated with TRITC-conjugated anti-mouse IgG (1:300), for 1 h at room temperature. Non-specific staining was assessed by overnight incubation with 2% BSA instead of the primary antibody.

For characterization of IR-MENk granule-like structures, cultured splenic macrophages were fixed as described above. Antigen retrieval was performed with 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0 at  $55^\circ\text{C}$ . Permeabilization with 0.25% Triton X 100-PBS was followed by the addition of 0.6%  $H_2O_2$  for MENk oxidation. After blocking with 0.5% casein-0.1% Triton X 100-PBS cells were incubated overnight with a VAMP-1/2 antibody and the MENk-(o) antiserum both diluted 1:200, at  $4^\circ\text{C}$ . After extensive washing, cells were incubated simultaneously with FITC anti-mouse IgM (1:100) and TRITC-anti-rabbit IgG (1:250) for 2 h at room temperature. Non-specific staining was assessed by overnight incubation with 0.5% casein instead of primary antibodies.

Nuclei were stained with 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 5 min. Photomicrographs were obtained with a Nikon TE-2000 epifluorescence microscope (Tokyo, Japan) coupled to a digital image acquisition system and the NIS-Elements<sup>®</sup> software.

#### Immunoblotting for proenkephalin A

Mononuclear splenocytes were isolated and homogenates were obtained after incubation with RIPA buffer (50 mM Tris/NaCl pH 7.4, 1% Nonidet<sup>™</sup> P-40, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM NaF, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Aprotinin,

1 µg/mL Pepstatin, 1 µg/mL Leupeptin) for 1 min at 4 °C and three pulses (5 s) of sonication. The amount of protein in the samples was determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951) using BSA for the standard curve. Samples were loaded into 12% SDS-polyacrylamide gels and electrophoresed at 100 V during 2 h. SDS-PAGE was performed using Laemmli's buffer system (Laemmli, 1970). Protein molecular weight markers of mid/low range from AMRESCO (Solon, OH) were loaded in lane 1. Proteins were electrically transferred to nitrocellulose membranes at 100 V for 1 h, followed by overnight blocking incubation with 0.25% Tween 20/Tris-buffered saline (TTBS). Membranes were then incubated with specific MERF antiserum diluted 1:1000 in TTBS, at 4 °C, during 2 h. Detection of bound-antibody was done with Amplified Alkaline Phosphatase Goat Anti-Rabbit Immun-Blot<sup>®</sup> Assay kit from Bio-Rad (Hercules, CA), according to manufacturer's instructions. Membranes were washed between all incubation steps with TTBS buffer.

#### Characterization of MENk-(o) antiserum

Specificity of MENk-(o) antiserum used in this study was assessed by Dot Blot. Briefly, 2 µL aliquots containing 50–200 ng of pure MENk were spotted onto nitrocellulose membranes and fixed with 4% PFA-0.25% glutaraldehyde for 15 min (Hulen et al., 1991). Membranes were incubated with 1 M glycine for 15 min and then washed with TBS before incubation with 0.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for MENk oxidation. After non-specific site blocking with 0.5% casein, membranes were incubated with the MENk-(o) antiserum diluted 1:1000 for 2 h. Extensive washing was followed by incubation with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG diluted 1:10000 and spots were revealed by ECL. Images were acquired with a GS-800 densitometer from Bio-Rad. As a negative control of immunodetection, membranes were incubated with 0.5% casein instead of the MENk-(o) antiserum.

#### <sup>35</sup>S-Methionine incorporation and immunoprecipitation of MECPs

Macrophages were incubated with 3.6 µCi of <sup>35</sup>S-methionine (1175.0 Ci/mmol) (PerkinElmer, Boston, MA) for 5 h. Supernatants were withdrawn and washed cells were scraped off with RIPA buffer. Macrophage extracts were treated overnight with 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for MENk oxidation. Each sample was divided into triplicates and then immunoprecipitated with MENk-(o) antiserum diluted 1:300, overnight, at 4 °C. Aliquots for protein determination were taken before incubation with MENk-(o) antiserum. A second precipitation was achieved with pre-washed 10% Pansorbin<sup>®</sup> cells (Calbiochem<sup>®</sup>-EMD Millipore; Billerica, MA) diluted 1:6, for 2 h in an ice-bath. Samples were centrifuged at 3000xg for 5 min and then at maximum speed for 1 min to form a compact pellet. The supernatants were discarded and the pellet washed twice and resuspended in 100 µL PBS. Samples were assayed for radioactivity by

the addition of 10 mL Sigma-Fluor<sup>®</sup> cocktail and counts per minute (cpm) were determined with a Beckman-Coulter LS6500 liquid scintillation system (Fullerton, CA).

#### Immunocytochemical detection of MECPs

Splenic macrophages were fixed with 4% PFA, washed and then incubated with 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0 at 55 °C for antigen retrieval. Permeabilization with 0.5% Triton X 100-PBS was followed by the addition of 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min in order to deplete endogenous peroxidase activity and MENk oxidation. After blocking with 3% donkey serum-0.25% Triton X 100-PBS, cells were incubated overnight with MENk-(o) antiserum diluted 1:200, at 4 °C. After extensive washing, cells were incubated with biotinylated anti-rabbit IgG diluted 1:250, for 2 h at room temperature. Color reaction was developed using Vectastain<sup>®</sup> ABC kit Elite Standard and DAB/Ni kit (both from Vector Laboratories, Burlingame, CA) according to manufacturer's recommendations. Cells were counterstained with hematoxylin-eosin. Non-specific staining was assessed by overnight incubation with blocking solution instead of MENk-(o) antiserum. Photomicrographs were obtained with a Nikon TE-2000 microscope coupled to a digital image acquisition system. Optical density of immunoreactive-MENk (IR-MENk) material was determined using Image Pro<sup>®</sup> Plus software (Media Cybernetics, Rockville, MD).

#### Animal immunization and pharmacologic treatment

For evaluation of the primary immune response, animals were immunized by receiving a single intraperitoneal injection of a SRBC suspension (1 x 10<sup>9</sup> cells) at 11:00 h, four days before sacrifice. LL-exposed rats were i.p. injected with 0.2 mg/kg of MENk, at 16:00 h, during 4 days after immunization.

#### Cytokine-secreting cells determination

The amount of IL-2- and IFN-γ-secreting cells was quantitatively determined by the ELISpot methodology. The assays were performed according to the protocol supplied by the manufacturer. Briefly, 1 x 10<sup>5</sup> viable splenocytes from immunized animals were put on each available antibody-coated well of the PVDF-backed microplate. Each sample was assayed in quadruplicate. Positive (recombinant rat IL-2 or IFN-γ) and negative (non-stimulated cells) controls, as well as background and detection antibody controls were assayed in duplicate. Microplates were incubated during 2 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. The detection system was constituted by a biotinylated polyclonal antibody specific for rat IL-2 or IFN-γ followed by streptavidin-conjugated alkaline phosphatase and BCIP/NBT as substrate. Blue-colored spots formed at the sites of cytokine localization. Each individual spot represents an individual cytokine-secreting cell (Klinman, 2008). To count the spots, a digital photograph was obtained from the bottom of each well and then processed through the



image analysis software Image-Pro<sup>®</sup> Plus. Results are expressed as the mean number of spot-forming cells/ $1 \times 10^5$  cells.

### IL-2 determination

Concentration of IL-2 in cell culture supernatants was determined by ELISA. Samples were assayed according to the protocol provided by the manufacturer. Briefly, 50  $\mu$ L of each sample, as well as the IL-2 standard curve and control included in the kit were incubated for 2 h in microplates that were pre-adsorbed with a specific anti-rat IL-2 antibody. The detection system was constituted by a peroxidase-conjugated anti-rat IL-2 antibody followed by TMB as enzyme substrate. Immediately after stopping the reaction with HCl, optical density reading at 450 nm was performed using a Beckman Coulter DTX-880 multimode detector (Fullerton, CA).

### IgM antibody-secreting cells determination

The number of IgM antibody-secreting cells was quantitatively determined as hemolytic plaque-forming cells by a modified Cunningham–Szenberg method (Cunningham & Szenberg, 1968). Briefly, chambers were prepared by gluing two 22 x 22 mm coverslips to a 25 x 75 mm slide using double-sided tape. A mixture of  $1.5 \times 10^7$  splenocytes from immunized animals plus a  $1 \times 10^8$  SRBC suspension and fresh guinea pig serum diluted 1:20 was put into four chambers, then sealed with warm paraffin wax, and incubated at 37 °C for 50 min in a humidified atmosphere. The number of plaque-forming cells was counted by both macro- and microscopic examination and expressed as the mean number of plaque-forming cells (PFC)/ $1 \times 10^6$  cells.

### Statistical analysis

Differences between two groups were determined by Student's *t*-test or Mann–Whitney Rank Sum Test. Comparisons between more than two groups were done by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Holm–Sidak *post hoc* test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## RESULTS

### General activity

During baseline rats displayed a robust activity rhythm synchronized with the LD cycle and with maximum levels of activity during the night (Figure 1A, top). The periodogram for this baseline indicated a 24 h-period (Figure 1B). From the beginning of LL-exposure (Figure 1A, black arrow), the activity rhythm was progressively lost until no clear day–night difference in activity was observed (Figure 1A, bottom). The periodogram corresponding to the last five days of LL exposure confirmed loss of circadian rhythmicity in general activity for all rats (Figure 1C). Daily average activity profiles also exhibited a robust circadian cycle for the LD-baseline (Figure 1D) and showed loss of circadian

rhythmicity for the last five days of LL-exposure (Figure 1E).

### Determination of splenic MENk content for a 24 h-period

Figure 2(A) shows that splenic MENk content determined for a 24 h-period displayed a bimodal pattern with a maximum peak found at 09:00 h (*zeitgeber* time (ZT) 2) and a second peak at 01:00 h (ZT 18) for LD-subjected rats. In contrast, splenic MENk content presented reduced levels and showed no significant variations throughout the 24 h-period in rats subjected to LL (Figure 2B).

### Melatonin determination

Serum melatonin measurement at 13:00 h showed no difference between rats exposed to LD- or LL-regimes ( $81 \pm 6$  versus  $60 \pm 11$  pg/mL, respectively); however, at 01:00 h, serum melatonin from LD-rats increased by 134% while in LL-rats we found similar values than during the subjective day ( $190 \pm 31$  versus  $64 \pm 12$  pg/mL;  $p < 0.05$  Student's *t*-test).

### Characterization of splenic macrophages in culture

Mononuclear splenocytes include lymphocytes, DCs and macrophages. Thus, in order to assure that cell isolation procedure and culture conditions are proper to obtain an enriched population of splenic macrophages, cultured cells were characterized by immunodetection of the surface marker sialoadhesin (CD169) as shown in Figure 3. Negative control where primary anti-CD169 antibody was omitted shows no immunofluorescence (upper panel). Lower panel shows positive staining of splenic CD169<sup>(+)</sup>-macrophages, which corresponds to  $96 \pm 1\%$  of the cells in culture.

### Synthesis of PEA and MECPs in cultured splenic macrophages

Figure 4(A) shows that the amount of proenkephalin A (PEA) precursor of 35 and 32 kDa recognized by a specific MERF antiserum decreased in splenocyte homogenates obtained from rats subjected to constant light. To evaluate MENk synthesis as well as subcellular content and distribution, specificity of MENk-(o) antiserum was assessed by Dot Blot. As shown in Figure 4(B), the antiserum used in this study revealed increasing reactivity with augmented concentrations of MENk. No recognition was observed when membranes were incubated with 0.5% casein instead of MENk-(o) antiserum. Evaluation of *de novo* synthesis of MECPs was performed by <sup>35</sup>S-Methionine incorporation to proteins. The relative amount of <sup>35</sup>S-labeled MECPs was diminished by 62% in homogenates from LL-derived macrophages as shown in Figure 4(C).

### Immunostaining of MECPs in splenic macrophages

In order to determine the subcellular distribution of MECPs and their relative content, macrophages were

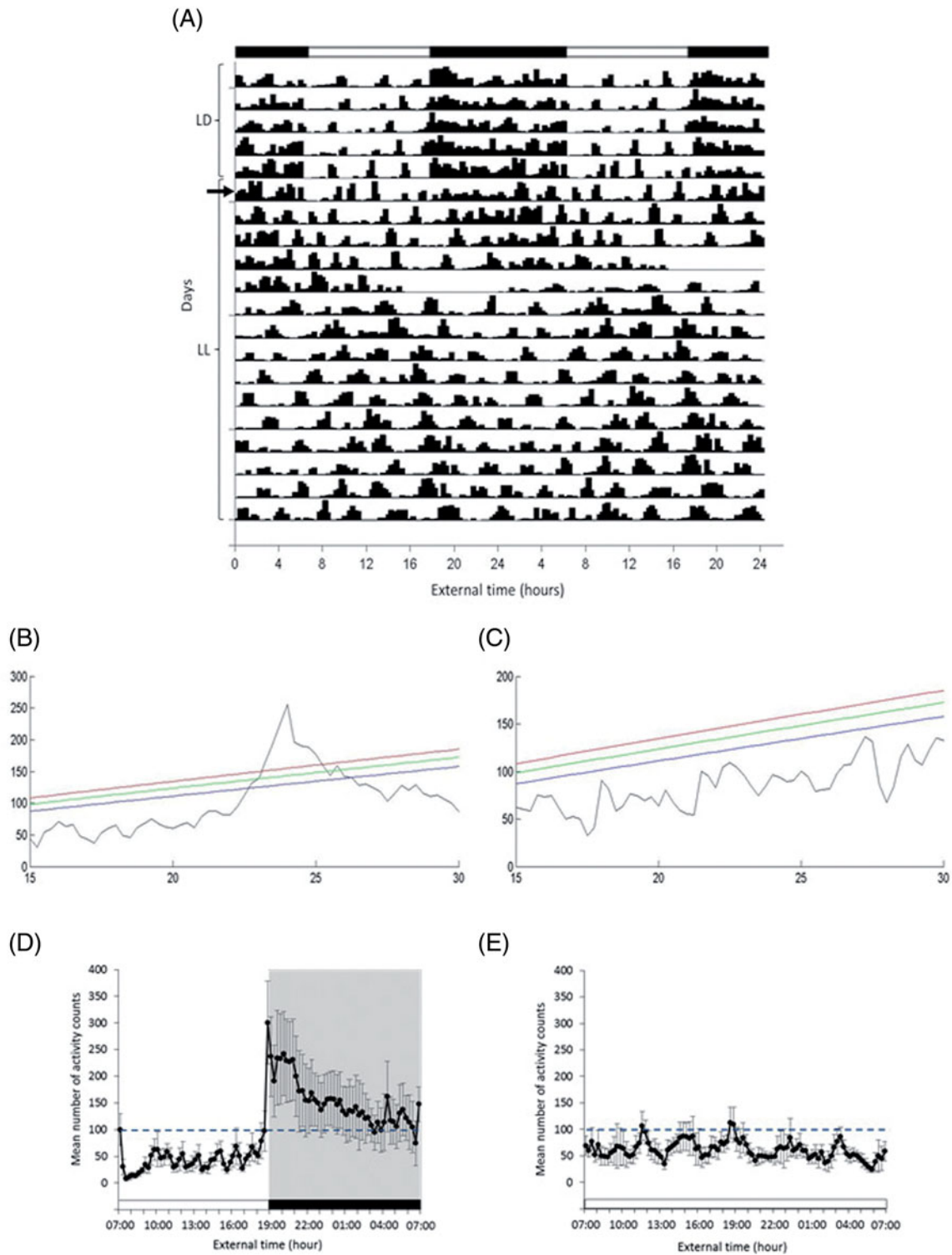


FIGURE 1. General activity monitoring. Rats were exposed to a 12:12 h LD cycle during 5 days (baseline) and then to constant light (LL) during 15 days. General activity was registered with sensors located under the animal cages as described in Material and Methods section. A representative double-plotted actogram is shown in panel A. Days of recording are represented on the ordinate axis and hours corresponding to external time are represented in the abscise axis. The change in lighting conditions to LL is indicated by the black arrow. The empty space on day 5 in LL was due to a transitory failure in the monitoring system. Corresponding periodograms obtained by  $\chi^2$  analysis for the baseline LD (panel B) or the last 5 days of LL (panel C) are presented. The parallel lines represent statistical significance. Activity profiles for each condition are depicted in panels D (LD-baseline) and E (last 5 days of LL). Data represent the mean  $\pm$  S.E.M ( $n=6$  rats). The horizontal dashed line represents mean daily activity during LD-cycle. White and black horizontal bars represent day and night, respectively (panels A, D and E).

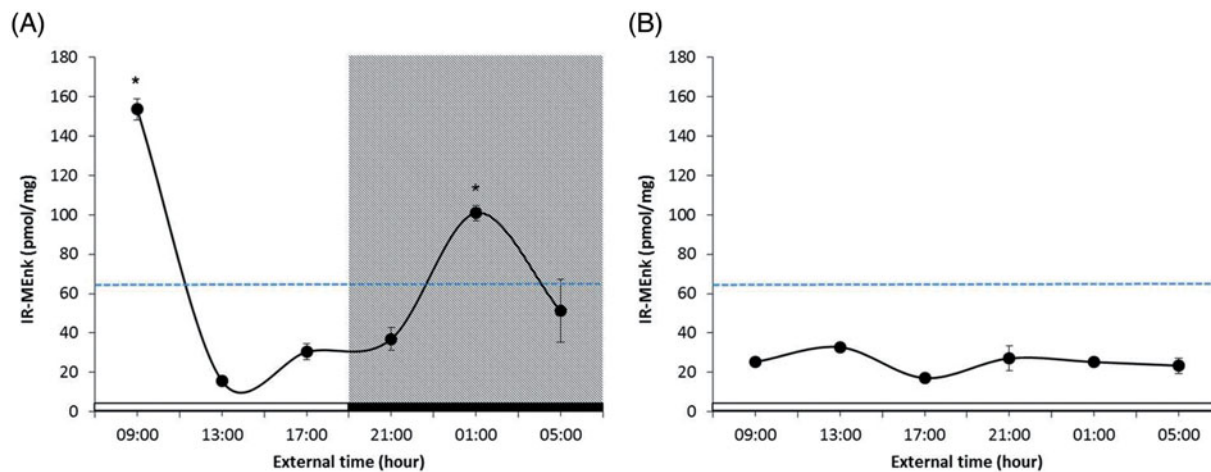


FIGURE 2. MENk splenic content for a 24-h period. MENk content was determined by radioimmunoassay in splenic peptide-enriched extracts obtained from rats exposed to a 12:12 h LD cycle (Panel A) or constant light (Panel B). Samples were obtained at 4 h-intervals throughout 24 h. Results are expressed as pmol of IR-MENk/mg of protein (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$ ). Statistical differences were determined by one-way ANOVA followed by the Holm-Sidak *post hoc* test. White and black horizontal bars represent day and night, respectively. The horizontal dashed line represents the mean level of splenic MENk content during LD-cycle.

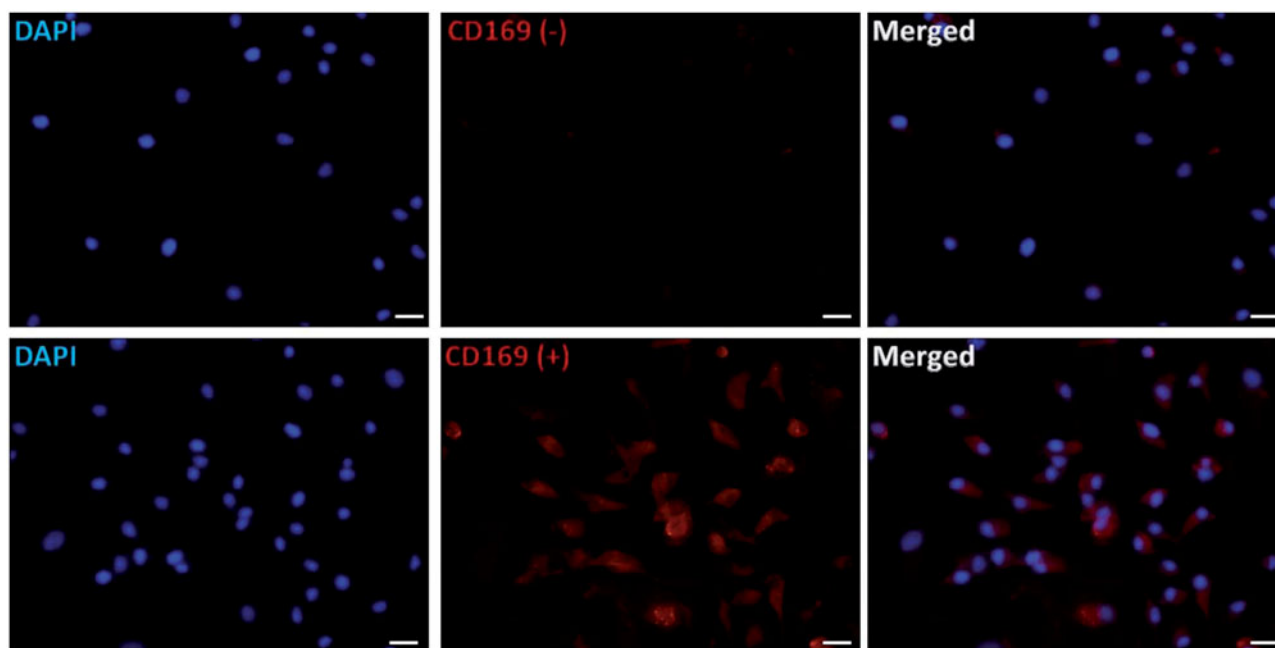


FIGURE 3. Characterization of splenic CD169(+) macrophages in culture. Mononuclear splenocytes were isolated and cultured as described in Material and Methods section. On the 6th day of incubation, non-adherent cells were withdrawn and macrophages fixed and immunostained with anti-CD169 and TRITC-conjugated anti-mouse IgG. Nuclei were stained with DAPI. Upper panel shows negative control without primary antibody. Lower panel shows positive staining of splenic CD169(+) macrophages, which corresponds to  $96 \pm 1\%$  of the cells in culture. Scale bar 20  $\mu$ m.

immunostained with specific MENk(o) antiserum. Figure 5 shows that nearly 90% of macrophages derived from LD- and LL-exposed rats were immunoreactive to MENk (Figure 5A and 5B, respectively). However, MECPs staining decreased in macrophages derived from rats exposed to constant light. Densitometric analysis of MECPs-staining (Figure 5C) showed a 40% reduction in O.D./cell in macrophages from rats exposed to LL regime.

MECPs subcellular distribution showed a punctate pattern and localization in well-defined granule-like structures of about 1–2  $\mu$ m in macrophages derived from rats subjected to a photoperiodic regime (Figure 6A). By contrast, macrophages from rats exposed to constant light showed a punctate immunostaining of MENk-containing material, but no granule-like structures were observed (Figure 6B). Figure 6(C) showed a 90% reduction in the amount of macrophages presenting at

FIGURE 4. Synthesis of PEA and MECPs in cultured splenic macrophages. Panel A shows representative Western blot for PEA (35.32 kDa) in splenocyte extracts obtained from rats exposed to a 12:12 h LD cycle or constant light (LL). Extracts were electrophoresed in a 12% polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane and immunodetected with a specific MERF antiserum (C-terminus of PEA). First lane: molecular weight markers. Panel B shows representative dot blot for MENk. Increasing amounts of pure MENk were dotted in nitrocellulose membrane and immunodetected with MENk-(o) antiserum. Panel C shows *de novo* synthesis of MECPs in cultured splenic macrophages. Cells were incubated with  $^{35}\text{S}$ -Methionine to allow incorporation to protein synthesis. Extracts were immunoprecipitated with MENk-(o) specific antiserum and radioactivity detected by liquid scintillation. Results are expressed as cpm/mg protein (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$ ). Statistical difference was determined by Mann-Whitney Rank Sum Test \* $p < 0.001$ .

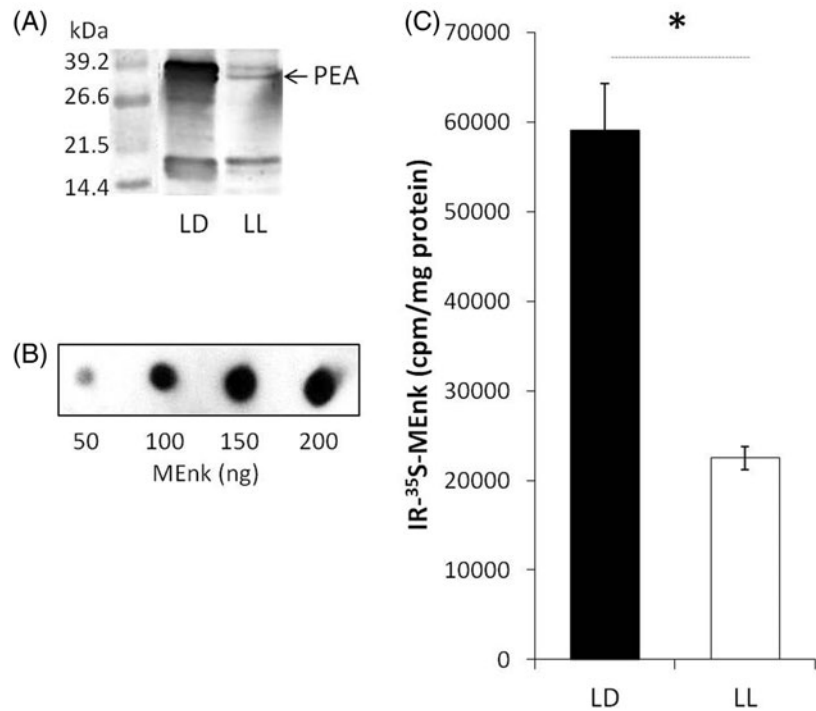
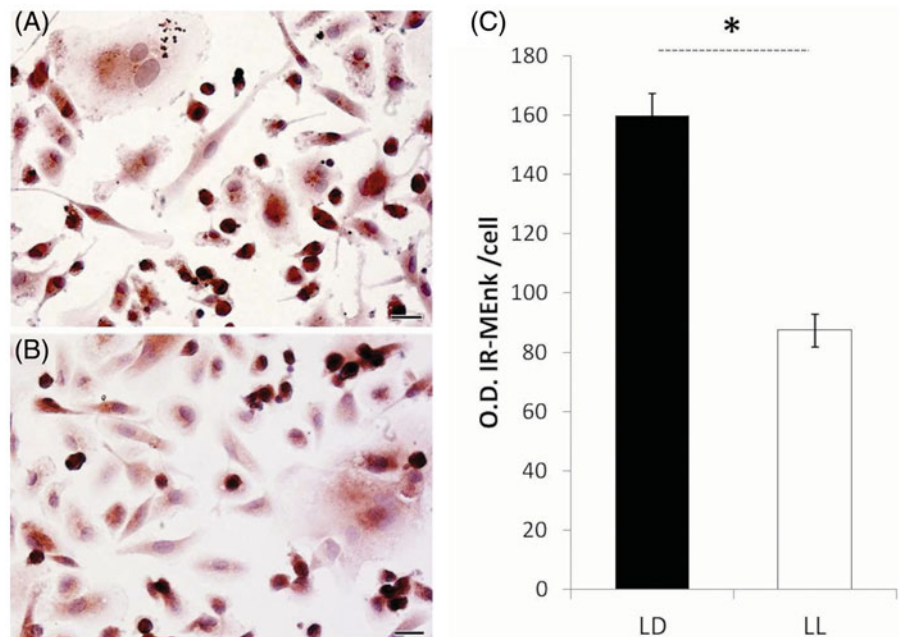


FIGURE 5. Immunocytochemical detection of MECPs in cultured splenic macrophages. Panels A and B show representative photomicrographs of macrophages obtained from rats that were exposed to 12:12 h light-dark regime (LD) or constant light (LL), respectively. Fixed macrophages were immunostained with MENk-(o) antiserum followed by biotin-conjugated anti-rabbit IgG. Color reaction was developed with Vectastain<sup>®</sup> ABC and DAB as substrate for peroxidase. Scale bar 20  $\mu\text{m}$ . Panel C shows densitometric analysis of MENk-immunoreactive material per cell, determined from 20 randomly chosen fields and expressed as the mean O.D./cell  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  Student's *t*-test.



least one discrete granule-like structure of IR-MENk material in cells derived from rats exposed to constant light.

To characterize IR-MENk granule-like structures, splenic macrophages were stained with the MENk-(o) antiserum and a VAMP-1/2 antibody which recognizes a specific protein marker located in the membrane of secretory vesicles. As shown in Figure 6(D), both VAMP-1/2 antibody and MENk-(o) antiserum recognized vesicular structures in macrophages obtained from rats exposed to a LD regime and a clear co-localization

staining was found (Figure 6D merged). In contrast, a reduced IR-MENk vesicular staining was observed in macrophages derived from LL-subjected rats (Figure 6E). In these cells, immunodetection of VAMP-1/2 showed a vesicular pattern with almost no co-localization with MENk staining (Figure 6E merged).

#### Evaluation of primary immune response in SRBC-challenged rats and splenic mononuclear cells

To evaluate the primary immune response of animals exposed to constant light, rats were injected with SRBC



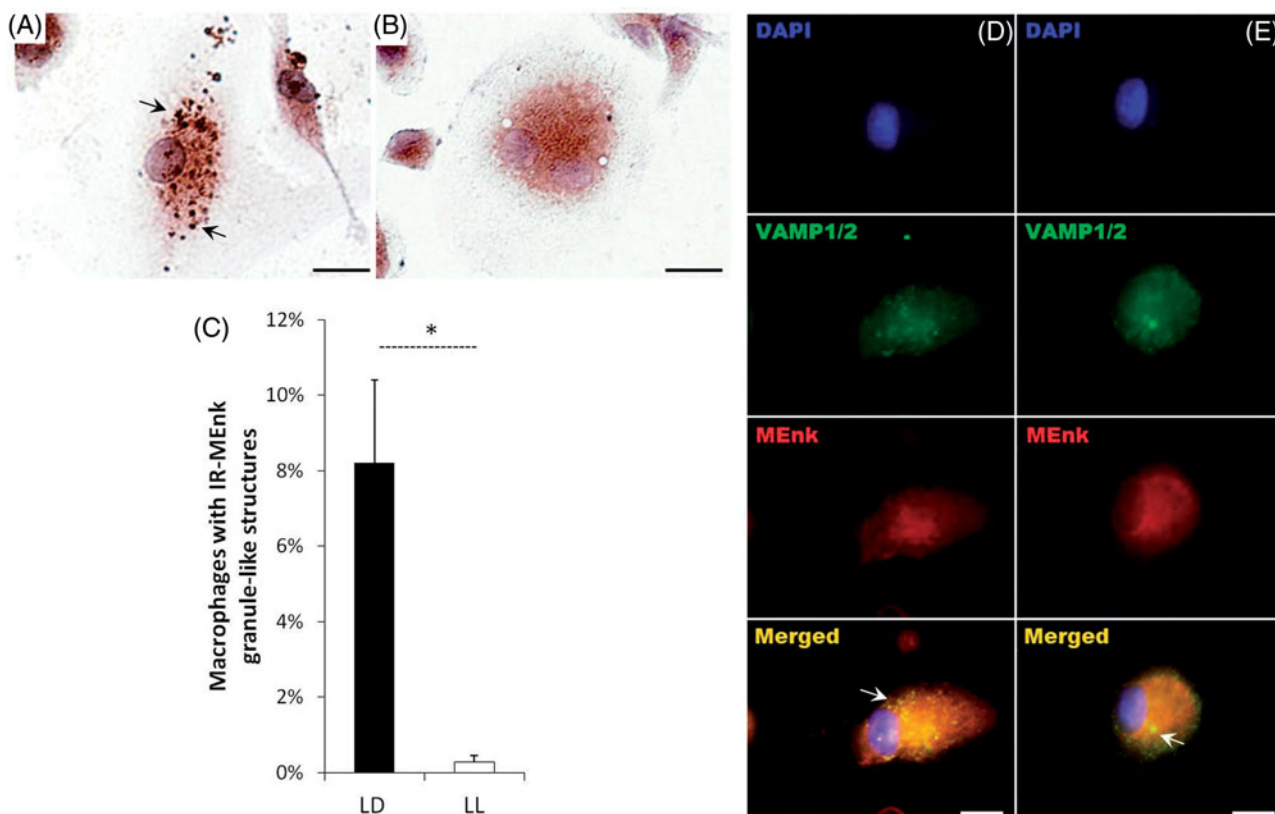


FIGURE 6. Subcellular distribution of MECPs in cultured splenic macrophages. Representative photomicrographies of macrophages from rats exposed to a 12:12 h LD regime (panel A) or macrophages from rats exposed to constant light (LL) (panel B) are shown. Fixed macrophages were immunostained with MENk-(o) antiserum followed by biotin-conjugated anti-rabbit IgG. Color reaction was developed with Vectastain<sup>®</sup>ABC and DAB as substrate for peroxidase. Black arrows show IR-MENk granule-like structures. Panel C: Macrophages showing IR-MENk granule-like structures  $>1\ \mu\text{m}$  were determined in 10 randomly chosen fields of each group.  $*p < 0.05$  Student's t-test. Panels D and E: Characterization of IR-MENk secretory granules with the vesicle membrane marker VAMP-1/2 in LD-derived macrophages (panel D) and LL-derived macrophages (panel E). Fixed macrophages were immunostained with MENk-(o) antiserum followed by TRITC-conjugated anti-rabbit IgG, and with VAMP-1/2 antibody (IgM) followed by FITC-conjugated anti-mouse IgM. Nuclei were stained with DAPI. White arrows indicate co-localization of MENk and VAMP-1/2 in secretory granules. Scale bar  $20\ \mu\text{m}$ .

and the number of cytokine-secreting cells and antibody-forming cells were determined in isolated splenocytes by ELISpot and Cunningham's plaque-forming assays, respectively. Splenocytes from LL-subjected rats showed a reduction of 38% in the number of IL-2-secreting cells (Figure 7A), as well as a 20% diminution in the number of antibody-forming cells (Figure 7B). Also, a borderline significant 35% decrease in the number of IFN- $\gamma$ -secreting cells was observed in splenocytes from LL-rats, while the amount of these cells increased by 200% in LL-rats treated with 0.2 mg/kg MENk (Figure 7C).

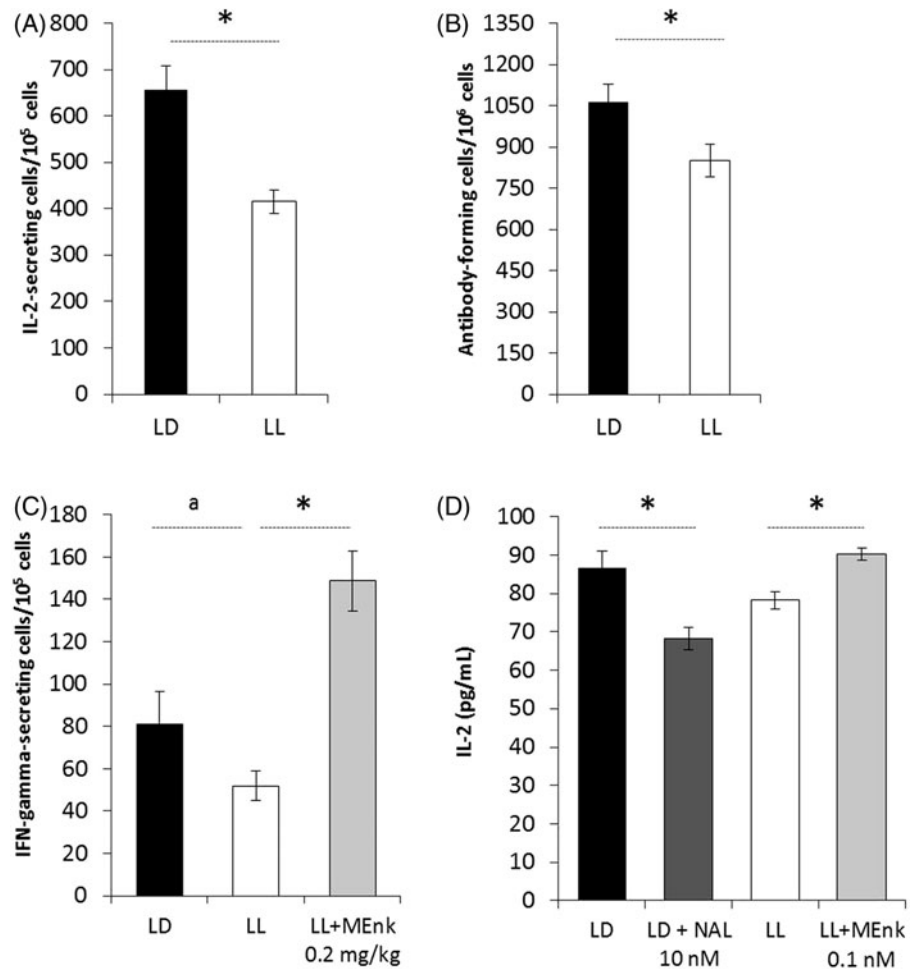
To evaluate immune response *in vitro*, mononuclear splenocytes were stimulated with SRBC and IL-2 was determined in culture supernatants. After incubation of LD-derived splenocytes with 10 nM naloxone, IL-2 concentration was decreased by 20%, while treatment with 0.1 nM MENk increased IL-2 concentration by 15% in the culture supernatants of LL-derived splenocytes (Figure 7D).

## DISCUSSION

Locomotor activity rhythm of nocturnal animals maintained in LL for a short time presents a period longer than 24 h, a daily phase delay (Aschoff, 1981), as well as the progressive dampening of the amplitude of circadian oscillations (Pittendrigh, 1981). In the present study, rats maintained under LD presented a robust circadian rhythm for general activity with highest levels during the night, as expected. The periodogram and the daily activity profile indicated that after 15 days in LL circadian rhythmicity of general activity was abolished. Previous reports that evaluate the consequences of constant light on locomotor activity in rats have shown two different results, i.e. if wheel-running activity is measured a clear rhythm persisted during more than 15 days with a delay of approximately 1 h in free-running period (Lax et al., 1999). In contrast, reports in which rats were fed *ad libitum* and general activity was detected with a dispositive located under the cage, rhythm loss was observed after several days in LL



FIGURE 7. Evaluation of primary immune response after SRBC-challenge. Panels A, B and C: evaluation of primary immune response in SRBC-immunized rats. The number of cytokine-secreting cells and antibody-forming cells were determined by ELISpot assay and Cunningham's plaque-forming assay, respectively. Animals were exposed to a 12:12 h LD regime or constant light (LL). MENk (0.2 mg/kg) was administered i.p. during four consecutive days after immunization. Panel D: *in vitro* evaluation of primary immune response in SRBC-stimulated mononuclear splenocytes derived from LD- or LL-exposed rats. Splenocytes were stimulated with SRBC and incubated with either naloxone (NAL) or MENk as indicated. IL-2 was determined in cell culture supernatants by ELISA. Results represent the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$ , two independent experiments. Panels A and B: \* $p < 0.05$  Student's t-test, panels C and D: \* $p < 0.05$ , "a"  $p = 0.05$ . One-way ANOVA followed by the Holm-Sidak *post hoc* test.



(Cambras et al., 2011, 2012; Novakova et al., 2011; Tapia-Osorio et al., 2013). This difference is explained because exercise on the wheel is a factor that can enforce the circadian system to express a robust circadian oscillation in LL (Lax et al., 1998; Yamanaka et al., 2013). In this study, though monitoring of general activity and samples were obtained from different groups of rats, animals were kept under similar experimental conditions (i.e. constant light during 15 days, with an average light intensity of 75 lux for general activity monitoring and 50 lux for the rest of the experiments). This suggests that MENk synthesis and content as well as immune response were evaluated from rats without a defined circadian pattern of general activity.

Furthermore, the mean activity profile of the LL-subjected rats showed dampened levels of activity during the 24 h. In this regard, evidence indicates that LL exposure produce dampening of diverse physiological rhythms (Coomans et al., 2013; Gil-Lozano et al., 2014; Hriscu et al., 2002; Sudo et al., 2003). In accordance with this evidence, we found that both the oscillations and the amount of splenic MENk content throughout a 24 h-period in LD-exposed rats were blunted in rats exposed to LL. In addition, evaluation

of the MENk protein precursor by Western blot showed that the two immunoreactive bands of 32–35 kDa consistent with those reported previously for the glycosylated and unglycosylated forms of PEA (Mathis & Lindberg, 1992) were diminished in LL-derived splenocytes. Taken together, these data strongly suggest that exposure to LL affects the synthesis of PEA and its derived peptides in rat spleen.

Since splenocytes are constituted of different kinds of immunocompetent cells, we studied a splenic CD169<sup>(+)</sup>-macrophage population which in rat corresponds to both marginal zone macrophages and marginal metallophilic macrophages (O'Neill et al., 2013). These cells perform the clearance of blood-borne pathogens (den Haan & Kraal, 2012) and interact with DCs (Backer et al., 2010) and with antigen-activated B-lymphocytes (Nikbakht et al., 2013). By these means, CD169<sup>(+)</sup>-macrophages constitute a bridge between innate and adaptive immune responses.

We found that *de novo* synthesis of MECPs in splenic CD169<sup>(+)</sup>-macrophages was significantly reduced when rats were exposed to a LL-regime. Moreover, we found that intracellular content and distribution of MECPs were also modified by environmental light. LL-derived

macrophages showed reduced intracellular IR-MENk content and lack of IR-MENk granule-like structures that could resemble individual secretory granules into which endogenous opioids are sorted in neuroendocrine cells (Fischer-Colbrie & Frischenschlager, 1985; Fleminger et al., 1983; Loh et al., 2002), or membranous vesicular structures similar to those observed for  $\beta$ -endorphin in immune cells (Mousa et al., 2004). The MENk-(o) specific antiserum used in this work has less than 0.01% cross-reactivity to all of its structure-related peptides (Asai et al., 1998). Therefore, the MECPs evaluated could be the MENk pentapeptide by itself, as well as fragments of different molecular weights derived from the sequential enzymatic cleavage of its precursor protein PEA, which contains four copies of MENk (Udenfriend & Kilpatrick, 1983). Given the high specificity of the antiserum, IR-MECPs should contain MENk sequence at the C-terminus. Co-localization of specific VAMP-1/2 and MECPs at the same granular structures strongly suggests that MECPs are stored in secretory granules. In this regard, the presence of VAMP-related proteins in murine macrophages and their probable role in exocytosis events have been documented (Pitzurra et al., 1996; Shukla et al., 2000). In agreement with the already mentioned findings, almost no co-localization of MENk and VAMP-1/2 vesicles was observed in LL-derived macrophages, suggesting that they have less stored MECPs.

Furthermore, our results pointed out an impairment of primary immune response in LL-exposed rats. The spleen of LL-rats showed a reduced number of anti-SRBC IgM-antibody forming cells as well as a reduced number of IL-2- and IFN- $\gamma$ -secreting cells. Since these cytokines are secreted at the early stages of a T-dependent humoral immune response (Gagro & Gordon, 1999; Kasproicz et al., 2003; Nishimura et al., 2002), our results suggest that exposure to constant light affects the early events of adaptive immunity and subsequently impair its final outcome. To trigger the transition from innate to adaptive immunity, macrophages could act as antigen presenting cells or transfer antigens to cross-presenting DCs, and also modulate proper activation of lymphocytes by cytokine secretion. Thus, reduced synthesis of splenic macrophage-derived MECPs in LL-exposed rats may contribute to compromise the immune response at early stages, since MENk is a direct modulator of lymphocyte activation and also influences the interaction between DCs and T-lymphocytes (Li et al., 2012, 2014; Liu et al., 2012; Shan et al., 2011). In this regard, our results support that early events of immune response, such as IL-2 secretion, are modulated through immune-derived opioid secretion and stimulation of opioid receptors.

Exposure to a LL-regime (from 0.2 to 300lux) has been reported to suppress pineal melatonin production, with a marked dampening of the amplitude of its circadian rhythm (Blask et al., 2009; Claustrat et al., 2008; Mendez et al., 2012). In our conditions, we found

that serum melatonin concentration from LL-rats at 01:00 h displayed similar values than during the subjective day, in contrast with increased nocturnal values found in LD-subjected rats. Melatonin exerts plenty immunomodulatory functions (Carrillo-Vico et al., 2013), and in both experimental and physiological conditions where its synthesis is reduced there is a dysregulation of the immune response (Cardinali et al., 2008). Among other mechanisms, melatonin influences immunity by modulating the production of cytokines (Garcia-Maurino et al., 2000). In this context, Maestroni et al. proposed the existence of a pineal-immuno-opioid network which would optimize immune responsiveness and counteract the immunosuppressive effects of stress and other environmental challenging conditions (Maestroni & Conti, 1992). Their evidence indicates that melatonin immunoenhancing effects could be mediated by an opioidergic mechanism (Maestroni et al., 1987, 1988). In this respect, a diminished level of circulating melatonin has been related to reduced enkephalin tissue content and release from rat CNS structures (Asai et al., 2007, 2010). Similarly, lymphoid organs as thymus and spleen from rats exposed to light-induced functional pinealectomy showed reduced tissue content of enkephalins (Valdes-Tovar et al., 2003). Moreover, Wajs et al. (1995) showed that melatonin could induce the synthesis of the opioid precursor proopiometelanocortin in rat lymphoid organs. Taken together, this evidence suggests that melatonin could endogenously modulate the synthesis of enkephalins in central and peripheral tissues, in response to changes in environmental light. In this regard, previous studies showed that a single dose of exogenous melatonin could reestablish MENk tissue content from both CNS structures and lymphoid organs of LL-rats, to levels observed in LD-rats (Asai et al., 2010; Valdes-Tovar et al., 2003). In agreement, preliminary results suggest that vespertine administration of melatonin during four days after a SRBC-challenge counteract the reduction in cytokine-secreting cells observed in LL-rats (unpublished data).

The observed effects of the LL condition may be associated with disturbance of central or peripheral oscillators as well as to the lack of a LD-cycle. In this regard, Marpegan et al. (2009) found that diurnal variation in LPS-induced mortality and survival time was only present when animals were exposed to a LD-cycle, while under constant darkness conditions animals showed increased mortality independent of the time of LPS-challenge. Based on this evidence, they propose that exposure to a cyclic environmental LD regime represents a benefit to overcome an immune challenge. Preliminary results indicate that only five cycles of LD after a 15-day LL exposure are enough to reestablish macrophage MENk content and IL-2 secretion from antigen-stimulated splenocytes, to levels found in LD-rats (manuscript in preparation). Further research is needed to address the precise mechanisms underlying

the effects of exposure to altered light regimes in enkephalin-mediated immunomodulation.

In conclusion, evidence indicates that exposure of rats to constant light which implies the suppression of nocturnal pineal melatonin and disruption of general activity rhythm, abolishes splenic MENk daily oscillations and inhibits enkephalin synthesis in CD169<sup>(+)</sup>-splenic macrophages. Furthermore, this environmental condition induces an impairment of the primary immune response which might be due to suboptimal macrophage-mediated early events of the adaptive immunity modulated by enkephalins. Data strongly suggest that the lack of a LD cycle could affect the biosynthesis of immunomodulators as macrophage-derived MECPs and thus, influence the final outcome of immune responses in a detrimental way. Addressing strategies to overcome these environmental changes, such as implementation of light hygiene habits in population, should become a matter of public health in order to prevent diseases associated with impaired immunity.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to Dr Rosalinda Tovar (CINVESTAV, Mexico) for providing the primary and secondary antibodies for VAMP-1/2 detection. Also, authors are thankful to Aline Domínguez-Alonso for her encouragement throughout the development of this project. As well, authors thank Mrs Martha Varela for administrative assistance.

#### DECLARATION OF INTEREST

The authors certify that there is no conflict of interest regarding the material discussed in the manuscript. Authors acknowledge the *Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*, and state that this article is a requirement for Marcela Valdés-Tovar to obtain the degree of Doctora en Ciencias (Ph.D. in Science) in this postgraduate program.

#### REFERENCES

- Anisimov VN, Vinogradova IA, Panchenko AV, et al. (2012). Light-at-night-induced circadian disruption, cancer and aging. *Curr Aging Sci.* 5:170–7.
- Asai M, Mayagoitia L, Garcia D, et al. (2007). Rat brain opioid peptides-circadian rhythm is under control of melatonin. *Neuropeptides.* 41:389–97.
- Asai M, Valdés-Tovar M, Matamoros-Trejo G, et al. (2010). Melatonin induces enkephalins synthesis and release in the rat brain. *Salud Mental.* 33:123–31.
- Asai M, Zubieta M, Matamoros-Trejo G, et al. (1998). Diurnal variations of opioid peptides and synenkephalin in vitro release in the amygdala of kindled rats. *Neuropeptides.* 32:293–9.
- Aschoff J. (1981). Free running and entrained circadian rhythms. In Aschoff J, ed. *Handbook of behavioral neurology Vol.4 biological rhythms.* New York: Plenum Press, pp. 81–93.
- Backer R, Schwandt T, Greuter M, et al. (2010). Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8<sup>+</sup> dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:216–21.
- Bedrosian TA, Aubrecht TG, Kaugars KE, et al. (2013). Artificial light at night alters delayed-type hypersensitivity reaction in response to acute stress in Siberian hamsters. *Brain Behav Immun.* 234:39–42.
- Bedrosian TA, Fonken LK, Walton JC, et al. (2011). Chronic exposure to dim light at night suppresses immune responses in Siberian hamsters. *Biol Lett.* 7:468–71.
- Blask DE, Dauchy RT, Brainard GC, et al. (2009). Circadian stage-dependent inhibition of human breast cancer metabolism and growth by the nocturnal melatonin signal: Consequences of its disruption by light at night in rats and women. *Integr Cancer Ther.* 8:347–53.
- Boyum A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 97:77–89.
- Cambras T, Castejon L, Diez-Noguera A. (2011). Social interaction and sex differences influence rat temperature circadian rhythm under LD cycles and constant light. *Physiol Behav.* 103: 365–71.
- Cambras T, Castejon L, Diez-Noguera A. (2012). Social interaction with a rhythmic rat enhances the circadian pattern of the motor activity and temperature of LL-induced arrhythmic rats. *Physiol Behav.* 105:835–40.
- Cardinali DP, Esquifino AI, Srinivasan V, et al. (2008). Melatonin and the immune system in aging. *Neuroimmunomodulation.* 15:272–8.
- Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sanchez N, et al. (2013). Melatonin: Buffering the immune system. *Int J Mol Sci.* 14: 8638–83.
- Chen W, Liu J, Meng J, et al. (2012). Macrophage polarization induced by neuropeptide methionine enkephalin (MENK) promotes tumoricidal responses. *Cancer Immunol Immunother.* 61:1755–68.
- Cinzano P, Falchi F, Elvidge CD. (2001). The first World Atlas of the artificial night sky brightness. *Mon Not Roy Astron Soc.* 328: 689–707.
- Claustrat B, Valatx JL, Harthe C, et al. (2008). Effect of constant light on prolactin and corticosterone rhythms evaluated using a noninvasive urine sampling protocol in the rat. *Horm Metab Res.* 40:398–403.
- Coomans CP, van den Berg SA, Houben T, et al. (2013). Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity. *FASEB J.* 27:1721–32.
- Cunningham AJ, Szenberg A. (1968). Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology.* 14:599–600.
- den Haan JM, Kraal G. (2012). Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J Innate Immun.* 4: 437–45.
- Fischer-Colbrie R, Frischenschlager I. (1985). Immunological characterization of secretory proteins of chromaffin granules: Chromogranins A, chromogranins B, and enkephalin-containing peptides. *J Neurochem.* 44:1854–61.
- Fleminger G, Ezra E, Kilpatrick DL, et al. (1983). Processing of enkephalin-containing peptides in isolated bovine adrenal chromaffin granules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80:6418–21.
- Fonken LK, Kitsmiller E, Smale L, et al. (2012). Dim nighttime light impairs cognition and provokes depressive-like responses in a diurnal rodent. *J Biol Rhythms.* 27:319–27.
- Fonken LK, Lieberman RA, Weil ZM, et al. (2013). Dim light at night exaggerates weight gain and inflammation associated with a high-fat diet in male mice. *Endocrinology.* 154:3817–25.



- Fonken LK, Nelson RJ. (2014). The effects of light at light on circadian clocks and metabolism. *Endocr Rev.* 35:648–70.
- Gagro A, Gordon J. (1999). The interplay between T helper subset cytokines and IL-12 in directing human B lymphocyte differentiation. *Eur J Immunol.* 29:3369–79.
- Garcia-Maurino S, Pozo D, Calvo JR, et al. (2000). Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J Pineal Res.* 29:129–37.
- Gil-Lozano M, Mingomataj EL, Wu WK, et al. (2014). Circadian secretion of the intestinal hormone, glucagon-like peptide-1, by the rodent L-cell. *Diabetes.* doi:10.2337/db13-1501.
- Hriscu M, Saulea G, Ostriceanu S, et al. (2002). Circadian phagocytic activity in rats under light–dark and constant light regimens. *Rom J Physiol.* 39–40:17–26.
- Hulen D, Baron A, Salisbury J, et al. (1991). Production and specificity of monoclonal antibodies against calmodulin from *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil Cytoskeleton.* 18: 113–22.
- Kasprowicz DJ, Smallwood PS, Tyznik AJ, et al. (2003). Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4+ T cell effector function. *J Immunol.* 171:1216–23.
- Kavelaars A, Heijnen CJ. (2000). Expression of proenkephalin mRNA and production and secretion of enkephalins by human thymocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 917:778–83.
- Klinman D. (2008). ELISPOT assay to detect cytokine-secreting murine and human cells. *Curr Protoc Immunol.* Chapter 6: Unit 6.19.
- Kowalski J, Makowiecka K, Belowski D, et al. (2000). Augmenting effect of methionine-enkephalin on interleukin-6 production by cytokine-stimulated murine macrophages. *Neuropeptides.* 34: 187–92.
- Kowalski J. (1997). Effect of enkephalins and endorphins on cytotoxic activity of natural killer cells and macrophages/monocytes in mice. *Eur J Pharmacol.* 326:251–5.
- Kuis W, Villiger PM, Leser HG, et al. (1991). Differential processing of proenkephalin-A by human peripheral blood monocytes and T lymphocytes. *J Clin Invest.* 88:817–24.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680–5.
- LaMendola J, Martin SK, Steiner DF. (1997). Expression of PC3, carboxypeptidase E and enkephalin in human monocyte-derived macrophages as a tool for genetic studies. *FEBS Lett.* 404:19–22.
- Lax P, Zamora S, Madrid JA. (1998). Coupling effect of locomotor activity on the rat's circadian system. *Am J Physiol.* 275: R580–87.
- Lax P, Zamora S, Madrid JA. (1999). Food-entrained feeding and locomotor circadian rhythms in rats under different lighting conditions. *Chronobiol Int.* 16:281–91.
- Li W, Chen W, Herberman RB, et al. (2014). Immunotherapy of cancer via mediation of cytotoxic T lymphocytes by methionine enkephalin (MENK). *Cancer Lett.* 344:212–22.
- Li W, Meng J, Li X, et al. (2012). Methionine enkephalin (MENK) improved the functions of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) loaded with antigen. *Hum Vaccin Immunother.* 8: 1236–42.
- Liu J, Chen W, Meng J, et al. (2012). Induction on differentiation and modulation of bone marrow progenitor of dendritic cell by methionine enkephalin (MENK). *Cancer Immunol Immunother.* 61:1699–711.
- Loh YP, Maldonado A, Zhang C, et al. (2002). Mechanism of sorting proopiomelanocortin and proenkephalin to the regulated secretory pathway of neuroendocrine cells. *Ann NY Acad Sci.* 971:416–25.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265–75.
- Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. (1987). Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin Exp Immunol.* 68: 384–91.
- Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. (1988). Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology.* 63:465–9.
- Maestroni GJ, Conti A. (1992). The pineal-immuno-opioid network. Mechanisms and significance. *Ann N Y Acad Sci.* 650:56–9.
- Marotti J, Gabrilovac J, Rabatic S, et al. (1996). Met-enkephalin modulates stress-induced alterations of the immune response in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 54:277–84.
- Marpegan L, Leone MJ, Katz ME, et al. (2009). Diurnal variation in endotoxin-induced mortality in mice: Correlation with proinflammatory factors. *Chronobiol Int.* 26:1430–42.
- Martinez-Pomares L, Gordon S. (2007). Antigen presentation the macrophage way. *Cell.* 131:641–3.
- Mathis JP, Lindberg I. (1992). Posttranslational processing of proenkephalin in AtT-20 cells: Evidence for cleavage at a Lys-Lys site. *Endocrinology.* 131:2287–96.
- Mendez N, Abarzua-Catalan L, Vilches N, et al. (2012). Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. *PLoS One.* 7:e42713.
- Mosser DM, Edwards JP. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958–69.
- Mousa SA, Shakibaei M, Sitte N, et al. (2004). Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain. *Endocrinology.* 145:1331–41.
- Nikbakht N, Shen S, Manser T. (2013). Cutting edge: Macrophages are required for localization of antigen-activated B cells to the follicular perimeter and the subsequent germinal center response. *J Immunol.* 190:4923–7.
- Nishimura Y, Hosokawa T, Hosono M, et al. (2002). Insufficient interleukin-2 production from splenic CD4+ T cells causes impaired cell proliferation and early apoptosis in SAMPL, a strain of senescence-accelerated mouse. *Immunology.* 107: 190–8.
- Novakova M, Polidarova L, Sladek M, et al. (2011). Restricted feeding regime affects clock gene expression profiles in the suprachiasmatic nucleus of rats exposed to constant light. *Neuroscience.* 197:65–71.
- O'Neill AS, van den Berg TK, Mullen GE. (2013). Sialoadhesin – a macrophage-restricted marker of immunoregulation and inflammation. *Immunology.* 138:198–207.
- Padros MR, Vindrola O, Zunszain P, et al. (1989). Mitogenic activation of the human lymphocytes induce the release of proenkephalin derived peptides. *Life Sci.* 45:1805–11.
- Patey G, De La Baume S, Schwartz JC, et al. (1981). Selective protection of methionine enkephalin released from brain slices by enkephalinase inhibition. *Science.* 212:1153–5.
- Pittendrigh CS. (1981). Circadian systems: General perspective. In: Aschoff J, ed. *Handbook of behavioral neurology.* Vol. 4: Biological rhythms. New York: Plenum Press, pp. 57–80.
- Pitzurra L, Rossetto O, Chimienti AR, et al. (1996). Tetanus toxin-sensitive VAMP-related proteins are present in murine macrophages. *Cell Immunol.* 169:113–6.
- Portaluppi F, Smolensky MH, Touitou Y. (2010). Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiol Int.* 27:1911–29.
- Salzet M, Tasiemski A. (2001). Involvement of pro-enkephalin-derived peptides in immunity. *Dev Comp Immunol.* 25: 177–85.
- Shan F, Xia Y, Wang N, et al. (2011). Functional modulation of the pathway between dendritic cells (DCs) and CD4+T cells by the neuropeptide: Methionine enkephalin (MENK). *Peptides.* 32: 929–37.

- Sharp BM. (2003). Opioid receptor expression and intracellular signaling by cells involved in host defense and immunity. *Adv Exp Med Biol.* 521:98–105.
- Shukla A, Berglund L, Nielsen LP, et al. (2000). Regulated exocytosis in immune function: Are SNARE-proteins involved? *Respir Med.* 94:10–7.
- Shurlygina AV, Mitshurina SV, Verbitskaja LV, et al. (2010). Structure of nuclear chromatin in cells of lymphoid organs and blood from mice maintained under abnormal light–dark cycle and treated with benz(a)pyrene. *Bull Exp Biol Med.* 149:29–32.
- Sudo M, Sasahara K, Moriya T, et al. (2003). Constant light housing attenuates circadian rhythms of mPer2 mRNA and mPER2 protein expression in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Neuroscience.* 121:493–9.
- Tapia-Osorio A, Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, et al. (2013). Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behav Brain Res.* 252:1–9.
- Trufakin VA, Shurlygina AV, Michurina SV, et al. (2007). The influence of experimental desynchronization on the morphofunctional characteristics of mouse immune system. *Alaska Med.* 49: 169–76.
- Udenfriend S, Kilpatrick DL. (1983). Biochemistry of the enkephalins and enkephalin-containing peptides. *Arch Biochem Biophys.* 221:309–23.
- Valdes-Tovar M, Asai M, Matamoros-Trejo G. (2003). Melatonin effect over the opioid peptides tissue content in the rat immune system. *Salud Mental.* 26:46–56.
- Vindrola O, Padros MR, Sterin-Prync A, et al. (1990). Proenkephalin system in human polymorphonuclear cells. Production and release of a novel 1.0-kD peptide derived from synenkephalin. *J Clin Invest.* 86:531–7.
- Vinogradova IA, Anisimov VN, Bukalev AV, et al. (2010). Circadian disruption induced by light-at-night accelerates aging and promotes tumorigenesis in young but not in old rats. *Aging (Albany NY).* 2:82–92.
- Vujic V, Stanojevic S, Dimitrijevic M. (2004). Methionine-enkephalin stimulates hydrogen peroxide and nitric oxide production in rat peritoneal macrophages: Interaction of mu, delta and kappa opioid receptors. *Neuroimmunomodulation.* 11: 392–403.
- Wajs E, Kutoh E, Gupta D. (1995). Melatonin affects proopiomelanocortin gene expression in the immune organs of the rat. *Eur J Endocrinol.* 133:754–60.
- Yamanaka Y, Honma S, Honma K. (2013). Daily exposure to a running wheel entrains circadian rhythms in mice in parallel with development of an increase in spontaneous movement prior to running-wheel access. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 305:R1367–75.