



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INTERACCIONES ENTRE EL INTESTINO Y EL CEREBRO DURANTE UNA
INFECCIÓN POR SALMONELLA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Rebeca Méndez Hernández

TUTOR PRINCIPAL
Rudolf Marinus Buijs
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Leticia Moreno Fierros, FES Iztacala, UNAM
Luis Felipe Montaña Estrada, Facultad de Medicina, UNAM

Ciudad de México. Febrero, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Rudolf M. Buijs del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM con el apoyo de de DGAPA IG-200314 y CONACYT 220598.



Agradecimientos

A Ruud por su tiempo, guía, enseñanza y pasión por la ciencia.

A Maricarmen y mis compañeros del laboratorio por contribuir en este trabajo ya sea aportando ideas o ayudando con experimentos, en especial a Lupita por su apoyo y dedicación.

A la Dra. Leticia Moreno y al Dr. Luis Montaña por sus valiosas contribuciones y apoyo en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Rafael Camacho y la Biól. Sandra Hernández por su apoyo con el cultivo de Salmonella así como por proporcionar la cepa utilizada en este trabajo.

A la Dra. Erika Rendón y a la Biól. Priscila Torres por su apoyo con la histología e inmunohistoquímica de intestino.

Al Dr. Julio Carrero, la Dra. Clorinda Arias, el Dr. Samuel Ponce, la Dra. Cristina Fernández y el Dr. Adolfo García por su apoyo en la revisión de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por su apoyo para asistir al congreso *Society for Neuroscience* en octubre 2015 a presentar parte de los resultados reportados en esta tesis.

A mi familia y amigos que han contribuido directa o indirectamente al desarrollo de este trabajo, en especial a mi mamá, Gis y Beto.



Contenido

Resumen	7
1. El núcleo supraquiasmático y el sistema circadiano.	9
Los ritmos circadianos son importantes en la fisiología de los seres vivos.	9
El núcleo supraquiasmático: el reloj central.	9
La actividad rítmica de las neuronas del núcleo supraquiasmático está dada por un reloj molecular.	10
El núcleo supraquiasmático tiene conexiones con diversas áreas del hipotálamo.	11
El hipotálamo se comunica con la periferia a través de la vía humoral	12
El cerebro impone ritmo a los osciladores periféricos.	15
El control circadiano de la temperatura: un ejemplo de la regulación de la homeostasis por el hipotálamo y el núcleo supraquiasmático.....	15
La desincronización entre los diversos niveles de regulación del sistema circadiano produce enfermedad.	16
Ritmos circadianos en los mamíferos: la rata como modelo de estudio.	17
2. El sistema circadiano y el sistema inmune	18
El sistema circadiano interactúa con el sistema inmune.	18
La regulación circadiana del sistema inmune se da a distintos niveles.....	18
La respuesta inmune puede estar reguladas directamente por el cerebro.....	19
El núcleo supraquiasmático participa en la modulación circadiana de la respuesta inmune.....	20
El cerebro puede recibir información inmune a través de la vía humoral.	20
El cerebro puede comunicarse con el sistema inmune a través del sistema nervioso autónomo.....	21
3. La infección por Salmonella para estudiar la interacción intestino-cerebro en un contexto circadiano.	25
Las infecciones bacterianas tienen componentes circadianos.	25
El sistema nervioso autónomo puede detectar la respuesta inflamatoria intestinal.	



Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

26	
La infección por Salmonella como modelo para estudiar la respuesta inmune intestinal.....	27
Cinética de infección por Salmonella entérica (S. entérica).....	27
4. Hipótesis.....	31
5. Objetivos.....	31
6. Metodología.....	31
Estrategia experimental.....	31
Sujetos experimentales.....	32
Cepa infecciosa.....	32
Infección.....	32
Obtención de muestras.....	33
Homogenización y conteo en placa.....	34
Cuantificación de citocinas en sangre e intestino.....	34
Inmunohistoquímica del cerebro.....	35
Conteo de células positivas para c-fos.....	35
Inmunohistoquímica del intestino.....	36
7. Resultados.....	38
Cinética de infección de las ratas inoculadas en el día (ZT2) y en la noche (ZT14).	
38	
Actividad del núcleo supraquiasmático después de 72 horas de infección por Salmonella.....	40
Actividad del núcleo del tracto solitario después de 72 horas de infección por S. typhimurium.....	41
Actividad de otras áreas del hipotálamo después de la infección por S. typhimurium.....	42
Localización de S. typhimurium en el intestino.....	44
8. Discusión.....	44
Cinética de infección de las ratas inoculadas en el día (ZT2) y en la noche (ZT14).	
44	



Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

Activación neuronal inducida por <i>S. typhimurium</i>	45
C-fos como marcador de activación neuronal	46
Posible mecanismos involucrados en las diferencias circadianas en la infección. 47	
El papel de TNF- α en la infección por <i>S. typhimurium</i>	48
Modelo de infección	49
9. Conclusiones	50
10. Bibliografía.....	51
11. Figuras suplementarias.....	60



Resumen

El núcleo supraquiasmático del hipotálamo es una estructura cerebral encargada de coordinar los ritmos circadianos en los mamíferos. Éste coordina los ritmos a través de la comunicación neural y humoral que mantiene con la mayoría de los tejidos del cuerpo. De esta manera, el organismo presenta fluctuaciones en su conducta y en distintas variables fisiológicas como la glicemia, la concentración de hormonas en sangre o la temperatura corporal. Además, muchas de las funciones del sistema inmune también fluctúan de manera circadiana; y el núcleo supraquiasmático; en su papel de reloj central, parece tener la capacidad de modular la respuesta inmune ante antígenos circulantes como el lipopolisacárido dependiendo de la hora del día. Por otro lado, *Salmonella typhimurium* es un patógeno gastrointestinal del alta importancia epidemiológica que invade el epitelio intestinal y posteriormente a diversos órganos como el hígado y bazo. Se ha reportado que la infección por *Salmonella* en ratones se desarrolla de manera diferente dependiendo de la hora de inoculación, sin embargo, no es claro si el sistema nervioso y específicamente el núcleo supraquiasmático, tienen alguna importancia en modular estas diferencias. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar si la infección por *Salmonella* en ratas presenta diferencias circadianas y si el núcleo supraquiasmático está involucrado en mediar estas diferencias. Para ello, se inocularon ratas Wistar macho con *Salmonella typhimurium* en dos puntos temporales, al inicio de la fase de descanso y al inicio de la fase de actividad del animal. Después de 24, 60 y 72 horas de infección, se tomaron distintos tejidos para cuantificar la cantidad de *Salmonella* así como los niveles de la citocina proinflamatoria TNF alfa. De igual manera, se midió la actividad de diversos núcleos cerebrales involucrados en la transmisión de información inmune hacia el cerebro a través de inmunohistoquímicas para el marcador de actividad c-fos. Se observó que las ratas que fueron inoculadas en



Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

la fase de descanso tuvieron menor cantidad de Salmonella recuperada del intestino con respecto a las ratas inoculadas en la fase de actividad después de 72 de la inoculación. Dicha diferencia fue dependiente de la hora de inoculación y no de la hora de sacrificio, y estuvo relacionada con una diferencia en la producción de TNF alfa ante la bacteria, siendo ésta mayor durante la fase en la que se observó menor recuperación de Salmonella. Tras analizar la actividad neuronal del núcleo supraquiasmático y otros núcleos involucrados en la transmisión de información hacia el cerebro como el núcleo del tracto solitario, no se observaron diferencias entre los individuos infectados y sus respectivos controles, por lo que las diferencias circadianas observadas en este estudio parecen estar mediadas únicamente a nivel local. Asimismo, el modelo de infección utilizado indujo baja invasión bacteriana, resultando poco eficiente para estudiar la interacción intestino-cerebro, por lo que es necesario realizar más estudios que aborden la comunicación intestino-cerebro en un contexto circadiano.



1. El núcleo supraquiasmático y el sistema circadiano.

Los ritmos circadianos son importantes en la fisiología de los seres vivos.

Los organismos vivos, desde bacterias hasta mamíferos, se encuentran sujetos a un ciclo de luz-oscuridad dado por la rotación de la Tierra, por lo que han desarrollado un sistema que les permite sincronizar su fisiología y comportamiento de acuerdo a este ciclo, este sistema es denominado sistema circadiano. De esta manera, la mayoría de los mamíferos presentan ritmos en diversas funciones como la temperatura corporal, el ciclo sueño-vigilia, la concentración de ciertas hormonas, etc. El funcionamiento adecuado del sistema circadiano permite que el organismo anticipe variaciones en sus funciones fisiológicas en el horario más conveniente. Los mamíferos, por ejemplo, presentan un aumento en la glicemia al inicio de su periodo de actividad que les permite realizar sus actividades adecuadamente.

El núcleo supraquiasmático: el reloj central.

En los mamíferos, la fisiología circadiana se encuentra coordinada por el cerebro, específicamente por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Este núcleo ha sido identificado desde hace tiempo como el reloj central debido a que su lesión induce la pérdida de los ritmos de la actividad locomotora y de algunas hormonas como la corticosterona (Stephan & Zucker 1972; Moore & Eichler 1972). El núcleo supraquiasmático es un núcleo bilateral que se encuentra en la base del hipotálamo, de manera dorsal al quiasma óptico. Este núcleo consta de dos poblaciones neuronales principalmente, la primera expresa péptido vasoactivo intestinal (VIP) como neurotransmisor y se encuentra en la parte ventral del núcleo. Esta población neuronal recibe información de la retina a través del tracto retinohipotalámico y por lo tanto es capaz de responder a estímulos fóticos. La



segunda población neuronal se encuentra en la parte medial del núcleo y consta de neuronas que expresan arginina vasopresina (AVP) como neurotransmisor. Las neuronas AVP reciben proyecciones de las neuronas VIP y tienen, a su vez, proyecciones hacia distintas áreas del hipotálamo que controlan diversas funciones fisiológicas (Abrahamson & Moore 2001; Moore 2013). Esta organización neuronal sitúa al núcleo supraquiasmático en una posición ideal para regular la homeostasis de manera circadiana, ya que es capaz de recibir información fótica y coordinar las funciones reguladas por el hipotálamo de acuerdo al ciclo luz-oscuridad (Buijs et al. 2013)

La actividad rítmica de las neuronas del núcleo supraquiasmático está dada por un reloj molecular.

Además de la capacidad que tiene el núcleo supraquiasmático para recibir información fótica, las neuronas del núcleo supraquiasmático presentan ritmos autónomos en su actividad eléctrica. Estos ritmos endógenos están dados por el reloj molecular, que consiste de un asa de retroalimentación de expresión y represión génica, formada principalmente por las proteínas CLOCK, BMAL1, Cry y Per (Figura 1). CLOCK y BMAL1 forman un dímero que se une a la caja “E” para promover la expresión de *per* y *cry*. Después de su traducción, PER y CRY desestabilizan al complejo CLOCK/BMAL1 de modo que inhiben su propia transcripción. Con el tiempo, PER y CRY se van degradando y el ciclo comienza de nuevo, completando una vuelta en aproximadamente 24 horas (Bechtold et al. 2010; Colwell 2011; Hastings et al. 2014). Con este reloj molecular, el núcleo supraquiasmático puede generar ritmos autónomos, de modo que si el organismo se encuentra en oscuridad total, el ritmo de aproximadamente 24 horas se mantiene, fenómeno conocido como “libre corrimiento”. Aunado a esto, las neuronas del núcleo supraquiasmático se sincronizan al ciclo luz-oscuridad debido a su conexión con la retina, como se describió anteriormente. De esta manera, la luz funciona como un importante sincronizador o *zeitgeber* (ZT) en la fisiología

circadiana de los organismos. Cabe mencionar que además de la luz, existen diversos estímulos que también pueden fungir como sincronizadores de la fisiología circadiana, como la alimentación o la conducta social.

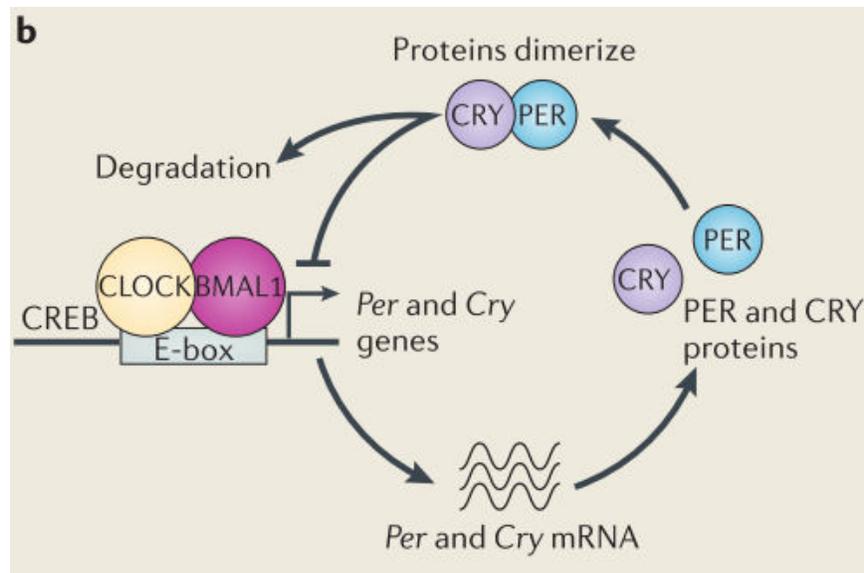


Figura 1. Reloj molecular. Las proteínas CLOCK y BMAL1 forman un dímero que se une a la caja E para promover la transcripción de los genes Per y Cry. Estos, al traducirse, se dimerizan y desestabilizan al complejo CLOCK/BMAL, de este modo inhibiendo su propia transcripción. PER y CRY se degradan con el tiempo, de modo que CLOCK y BMAL1 inician el ciclo de nuevo. Este ciclo es denominado “reloj molecular” y dura aproximadamente 24 horas. Tomado de Colwell 2011.

El núcleo supraquiasmático tiene conexiones con diversas áreas del hipotálamo.

El hipotálamo se encuentra situado en la base del cerebro y tiene un papel en la regulación de la mayoría de las funciones fisiológicas, como la temperatura corporal, el sueño, la conducta alimentaria, la secreción de hormonas, etc. Como se mencionó anteriormente, el núcleo supraquiasmático se comunica con diversos núcleos del hipotálamo como el núcleo paraventricular el núcleo dorsomedial, el



núcleo supraóptico, el núcleo arqueado, etc. Esto lo sitúa en una posición ideal para regular la fisiología de manera circadiana (Buijs et al. 2013; Kalsbeek et al. 2006). Existen principalmente dos vías por las que el hipotálamo y el núcleo supraquiasmático pueden coordinar los ritmos circadianos: la vía neural y la vía humoral. A través de estas dos vías, el núcleo supraquiasmático es capaz de intercambiar información con la periferia e integrarla, produciendo la ritmicidad biológica de los organismos (Figura 2).

El hipotálamo se comunica con la periferia a través de la vía neural.

En relación con la vía neural, las aferentes espinales y vagales comunican la información sobre el estado de los órganos al cerebro a través de distintos relevos como los ganglios de raíz dorsal (aferentes espinales) o el ganglio nodoso (aferentes vagales). La información de las aferentes llega al hipotálamo principalmente a través del núcleo del tracto solitario (NTS) en el tallo cerebral, que funciona como una importante entrada de información sensorial al cerebro. El núcleo del tracto solitario puede enviar información a varios sitios del hipotálamo incluyendo el núcleo supraquiasmático. El hipotálamo se encarga de integrar la información y después enviar la información de salida al cuerpo de nuevo. Por otro lado, el principal sitio de salida de información del hipotálamo es el núcleo paraventricular (PVN), que tiene proyecciones hacia el núcleo dorsomotor del vago (DMV) y la columna intermediolateral de la médula espinal (IML), por donde se da la salida de la información autonómica (parasimpática y simpática, respectivamente) hacia los órganos. Cabe mencionar que el núcleo supraquiasmático, a través del núcleo paraventricular, también proyecta hacia las entradas sensoriales del cerebro (núcleo del tracto solitario y cuerno dorsal de la médula espinal). De esta manera, es capaz de modular la información sensorial dependiendo de la hora del día (Buijs & Kalsbeek 2001).

El hipotálamo se comunica con la periferia a través de la vía humoral



El núcleo supraquiasmático también puede comunicarse con el resto del cuerpo a través de la vía humoral. Para ello, los órganos circunventriculares (sitios donde la barrera hematoencefálica es más laxa) detectan diversas moléculas presentes en la sangre circulante y comunican esta información a diversas áreas del hipotálamo. En relación con la salida humoral de la información, el núcleo paraventricular tiene proyecciones hacia centros de control hormonal como la hipófisis, por lo que los ritmos hormonales (por ejemplo, el ritmo de corticosterona) también se encuentran coordinados por el hipotálamo y el núcleo supraquiasmático (Buijs & Kalsbeek 2001; Dibner et al. 2010).

Con base en lo anterior, se puede afirmar que el núcleo supraquiasmático recibe información de distintos sistemas y, en respuesta a ésta, ajusta al organismo de acuerdo al estado fisiológico y ambiental del animal. De este modo, cualquier cambio importante en la fisiología del organismo deberá ser eventualmente transmitido al núcleo supraquiasmático para reajustar tanto el *input* como el *output* desde y hacia los órganos. Un claro ejemplo de esto es la regulación de la temperatura, que se describirá a posteriormente.

Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

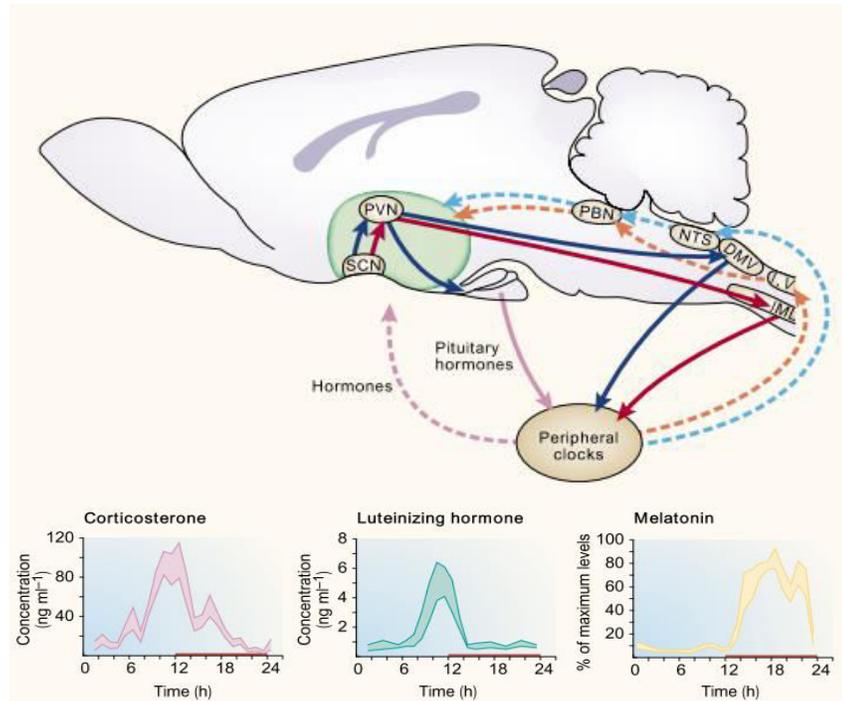


Figura 2. El núcleo supraquiasmático como reloj maestro. El núcleo supraquiasmático (SCN) se encuentra en la base del hipotálamo y es capaz de recibir información de la periferia a través de una vía neural o humoral. La información parasimpática llega hasta del núcleo del tracto solitario (NTS) de donde es transmitida hacia el hipotálamo utilizando al núcleo parabraquial (PBN) como relevo. La información simpática es transmitida al asta dorsal de la médula espinal (nivel I y V) de donde es transmitida igualmente hacia el hipotálamo. A su vez, el núcleo supraquiasmático tiene proyecciones hacia el núcleo paraventricular del hipotálamo, que regula la actividad parasimpática a través del núcleo dorsomotor del vago (DMV) o la actividad simpática a través de la columna intermediolateral de la médula espinal (IML). Asimismo, el núcleo supraquiasmático, a través del PVN, puede regular la secreción de hormonas por la glándula pituitaria. De este modo, el núcleo supraquiasmático puede tener un papel clave en el control de las fluctuaciones circadianas de hormonas como la corticosterona, la hormona luteinizante y la melatonina. Tomado de (Buijs & Kalsbeek 2001).



El cerebro impone ritmo a los osciladores periféricos.

A través de las conexiones previamente descritas, el cerebro puede sincronizar los ritmos circadianos del organismo como las fluctuaciones hormonales, el ritmo de temperatura o el ciclo sueño-vigilia. Además, la mayoría de los tejidos poseen su propio reloj molecular de manera que cada tejido pueda regular su fisiología circadiana de manera tejido-específica. Los componentes del reloj molecular de los osciladores periféricos son capaces de sincronizar muchas funciones celulares a través de los genes controlados por el reloj, asimismo, este ciclo puede ser modulado por otras proteínas a través de diversas cascadas de señalización (Golombek & Rosenstein 2010). Por lo tanto, el funcionamiento adecuado del sistema circadiano se logra a través de la coordinación de los diferentes tejidos, órganos y sistemas, donde el reloj central funciona como sincronizador maestro.

El control circadiano de la temperatura: un ejemplo de la regulación de la homeostasis por el hipotálamo y el núcleo supraquiasmático.

Uno de los parámetros que claramente varía de manera circadiana en los mamíferos es la temperatura basal. Ésta se encuentra alta durante el periodo de actividad del animal y baja durante su periodo de descanso. El núcleo supraquiasmático, en su papel de reloj central, regula estas variaciones circadianas en la temperatura utilizando sus conexiones con el área preóptica del hipotálamo. El área preóptica se ha identificado como el principal regulador de la temperatura corporal. Éste, a través de las vías sensoriales anteriormente descritas, detecta la temperatura corporal, integra la información y, utilizando las vías de salida descritas, promueve mecanismos como la vasoconstricción o vasodilatación para aumentar o disminuir la temperatura según se necesite (Clapham 2012). El núcleo supraquiasmático tiene conexiones con el área preóptica a través de las neuronas que utilizan como neurotransmisor a la vasopresina. En la rata, las neuronas vasopresinérgicas del núcleo supraquiasmático se encuentran activas durante el día y liberan una gran cantidad



de vasopresina hacia el área preóptica, induciendo una disminución en la temperatura basal. En la noche, estas neuronas vasopresinérgicas del núcleo supraquiasmático tienen una menor actividad al no ser estimuladas por la luz, por lo que no liberan la misma cantidad de vasopresina hacia el área preóptica y por lo tanto la temperatura basal aumenta (Guzman-Ruiz et al. 2015). Por otro lado, la lesión del núcleo supraquiasmático previene las fluctuaciones circadianas en la temperatura, lo que corrobora su importancia en la modulación de la temperatura de acuerdo al ciclo luz-oscuridad (Scheer et al. 2005).

La temperatura corporal también puede modificarse ante condiciones como infección bacteriana. A pesar de que aún no se han investigado con gran detalle los mecanismos subyacentes, hay evidencia para creer que el núcleo supraquiasmático ejerce una influencia en los cambios en la temperatura ante la endotoxemia. La administración intravenosa de LPS (una endotoxina proveniente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas) en ratas puede inducir un aumento o una disminución en la temperatura dependiendo de la hora a la que se administre. Si la endotoxina se administra en el día, se observa una clásica respuesta de hipertermia, mientras que si se administra en la noche, la temperatura disminuye (Guerrero-Vargas et al. 2014). Además, si se lesiona al núcleo supraquiasmático, la administración de LPS induce una hipertermia aún mayor. Estos datos corroboran la importancia del núcleo supraquiasmático en la modulación de la temperatura ante un reto inmune como LPS, aunque es necesario realizar más estudios para esclarecer mejor su papel.

La desincronización entre los diversos niveles de regulación del sistema circadiano produce enfermedad.

La importancia de estudiar los ritmos circadianos radica en que su alteración parece tener un efecto importante en la salud. Por ejemplo, las alteraciones en los ritmos circadianos producidas por los viajes aéreos transmeridionales pueden inducir en las personas malestar general, irritabilidad y depresión, afección conocida como *jet lag*. Estos problemas se pueden dar de manera transitoria



(dependiendo del número de husos horarios que se hayan cruzado) o pueden complicarse más si las personas viajan de manera recurrente (Salgado-Delgado et al. 2009). Además, los trabajadores nocturnos, cuyos horarios de actividad y alimentación están desfasados del ciclo luz-oscuridad, son más propensos a presentar diversas enfermedades como síndrome metabólico, cáncer o trastornos gastrointestinales (Knutsson 2003). Se propone que estos padecimientos se dan como consecuencia de una desincronización entre las señales recibidas del entorno (como la luz) y las señales internas (como las señales metabólicas en respuesta a la alimentación) (Salgado-Delgado et al. 2009; Moran-Ramos et al. 2016; Buijs et al. 2006).

Ritmos circadianos en los mamíferos: la rata como modelo de estudio.

Para estudiar la fisiología circadiana en mamíferos, han utilizado diferentes modelos animales como los roedores. Éstos presentan las ventajas de que son de fácil cuidado y manejo, además de tener muchas similitudes con el humano (Iannaccone & Jacob 2009). En cuanto a su conducta durante el ciclo circadiano, los roedores son animales nocturnos, a diferencia del humano y algunos otros mamíferos. Eso se refiere a que presentan su periodo de mayor actividad locomotora y alimentación en la fase de oscuridad. A pesar de ello, tanto en los animales nocturnos como los diurnos, el periodo de actividad locomotora y alimentación coincide con un estado anabólico y termogénico, mientras que el periodo de descanso coincide con un estado de baja actividad metabólica y termogénesis (Kumar Jha et al. 2015). De esta manera, es posible realizar comparaciones de la fisiología circadiana de la rata con la del ser humano si se toma como referencia la fase de actividad en lugar de la fase de luz. Por lo tanto, al ser un organismo ampliamente estudiado debido a las ventajas que presenta su estudio, la rata puede ser un buen modelo para elucidar los mecanismos detrás de los ritmos circadianos si se toman en cuenta las consideraciones anteriores. Este trabajo, por lo tanto, se enfocará a la fisiología circadiana de la rata.



2. El sistema circadiano y el sistema inmune

El sistema circadiano interactúa con el sistema inmune.

Como se describió anteriormente, la respuesta ante una endotoxina como el LPS puede ser diferente dependiendo de la hora de administración, lo que sugiere una interacción entre el sistema inmune y el sistema circadiano. En los últimos años se ha realizado mucha investigación abordando esta temática. Se ha observado que diversos componentes del sistema inmune como la cantidad de citocinas en sangre (Nakao 2014), el reclutamiento de los linfocitos a los tejidos (Scheiermann et al. 2012) o la actividad fagocítica de los macrófagos (Oliva-Ramírez et al. 2014), fluctúan de manera circadiana. De manera general, se propone que la respuesta inmune varía de modo que el individuo esté mejor preparado para encontrarse con un agente patógeno en el periodo en el que tiene mayor probabilidad de encontrarse con él, es decir, al inicio del periodo de actividad (Curtis et al. 2014). Sin embargo, muchos datos experimentales como la cantidad de linfocitos circulantes (que es mayor durante el periodo de descanso con respecto al periodo de actividad) no coinciden con esta hipótesis (Cermakian et al. 2013), por lo que es necesario realizar más investigación en esta área.

La regulación circadiana del sistema inmune se da a distintos niveles

Como se mencionó anteriormente, los ritmos circadianos se encuentran regulados a varios niveles y lo mismo sucede en el sistema inmune. Algunas células inmunes circulantes como los monocitos o las células B poseen un reloj molecular funcional al que se le atribuyen las fluctuaciones rítmicas en sus funciones celulares. Por ejemplo, se ha observado que los niveles en circulación de monocitos Ly6C^{hi}, que funcionan como la primera línea de defensa ante el patógeno *L. monocytogenes* varían de manera circadiana, lo que repercute en la eliminación de la bacteria. De esta manera, el reclutamiento de monocitos al tejido, y por lo tanto la eliminación de la bacteria, son mayores si se inocula a los



animales en la tarde que si se inoculan en la mañana. Si se depleta a los monocitos de la proteína BMAL1, componente del reloj molecular, la fluctuación circadiana en cantidad de monocitos así como su reclutamiento a los tejidos se pierde. Esto sucede mediante un mecanismo que involucra la represión directa por BMAL1 del gen *CCl2*, que codifica para un factor quimiotáctico de monocitos (Nguyen et al. 2013). De este modo, el reloj molecular de los monocitos tiene una influencia directa en la eliminación de la bacteria *L. monocytogenes*.

Por otro lado, se han descrito que algunas hormonas que fluctúan de manera circadiana como la melatonina o la corticosterona son capaces de influir directamente en la respuesta inmune a través de distintos mecanismos (Srinivasan et al. 2012; Chrousos 1995). Por ejemplo, se ha reportado que administrar melatonina a ciertos cultivos bacterianos puede inhibir su crecimiento, y que la administración de melatonina a pacientes con sepsis puede mejorar sus síntomas (Srinivasan et al. 2012). Sin embargo, no existen reportes de que las concentraciones endógenas de melatonina que se observan a lo largo del ciclo circadiano puedan tener un efecto importante en la inflamación.

La respuesta inmune puede estar reguladas directamente por el cerebro.

Además de los mecanismos celulares y humorales descritos, la respuesta inmune también puede estar regulada directamente por el sistema nervioso. Por ejemplo, se ha observado que la migración de los linfocitos hacia los tejidos se encuentra regulada de manera circadiana a través de la inervación noradrenérgica. De esta manera, al inicio de la fase de actividad, donde hay una mayor actividad del sistema simpático, se libera una mayor cantidad de noradrenalina hacia algunos tejidos como el músculo esquelético o la médula ósea. Esto promueve la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, de modo que en este momento del día existe una mayor migración de los linfocitos hacia este tejido (Scheiermann et al. 2012). De esta manera, el cerebro, y en especial el núcleo



supraquiasmático, podrían tener un papel importante en la modulación de la respuesta inmune a través de la inervación simpática o parasimpática de los tejidos encargados de montar esta respuesta.

El núcleo supraquiasmático participa en la modulación circadiana de la respuesta inmune.

Con relación lo anterior, se han realizado algunos estudios en los que se analizó la actividad neuronal del núcleo supraquiasmático después de un reto con lipopolisacárido (LPS) intravenoso. Cabe destacar que la actividad normal del núcleo supraquiasmático es alta durante el día y baja durante la noche. En los estudios mencionados, se observó que la administración de LPS a ratas o ratones durante su periodo de actividad está relacionado con un incremento en la actividad del núcleo supraquiasmático; mientras que si se administra esta endotoxina en el periodo de descanso, la actividad del núcleo no cambia (Guerrero-Vargas et al. 2014; Paladino et al. 2014). Además, al lesionar el núcleo supraquiasmático se observa una respuesta inmune exacerbada (mayor producción de citocinas) ante un reto con LPS (Guerrero-Vargas et al. 2014). Estos datos sugieren que el núcleo supraquiasmático tiene un papel importante en detectar y modular una respuesta sistémica ante un reto inmune aunque no es claro el mecanismo por el cual se da esta modulación, ni si esto sucede al retar al organismo con otro tipo de estímulo como una infección.

El cerebro puede recibir información inmune a través de la vía humoral.

Como se describió anteriormente, el núcleo supraquiasmático es importante en la modulación de la respuesta inmune, pero ¿cómo es que el núcleo supraquiasmático y el cerebro en general pueden detectar información del sistema inmune? Mediante la vía humoral, el cerebro puede detectar la presencia de citocinas o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) en la sangre a



través de los órganos circunventriculares (CVOs) como el área postrema (AP), el órgano vascular de la lámina terminal (OVLT) o el órgano subfornical (SFO) (Figura 3). Los órganos circunventriculares contienen receptores para varias citocinas como TNF- α o IL-6 así como receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRRs) como el TLR-4 que detecta LPS. Se cree que una de las funciones de esta detección es la modulación de ciertas conductas de enfermedad (*sickness behavior*) así como de la fiebre inducida por endotoxemia, de la que se habló anteriormente (Dantzer et al. 2000; Dantzer 2006). Los órganos circunventriculares, a su vez, pueden comunicar la información sobre el estado inflamatorio hacia el resto del cerebro a través de conexiones directas o mediante la producción local de citocinas que podrían difundir hacia diversas partes del cerebro incluyendo el hipotálamo (Dantzer 2006). En relación con esto, se ha observado que cortes de tejido del núcleo supraquiasmático, al ser estimulados *in vitro* con citocinas, responden con una disminución de la actividad eléctrica de las neuronas de este núcleo (Lundkvist et al. 2002; Nygård et al. 2009). No es claro si existe alguna importancia fisiológica de este hecho, ya que no se ha reportado si sucede *in vivo*.

El cerebro puede comunicarse con el sistema inmune a través del sistema nervioso autónomo.

Por otro lado, la vía neural parece tener un papel importante en la regulación de la inflamación. Tracey y colaboradores han observado que la estimulación eléctrica del nervio vago es capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria (Borovikova et al. 2000). A partir de esto y otros estudios (Bernik et al. 2002; Wang et al. 2003), se ha descrito un reflejo antiinflamatorio vagal (Figura 4), en el cual se propone que el nervio vago es capaz de detectar moléculas relacionadas con la inflamación en la periferia y activar al núcleo del tracto solitario. Éste, a manera de reflejo, activa el núcleo dorsomotor del vago de modo que las eferentes vagales señalicen, por ejemplo, a los macrófagos del tejido y se disminuya la producción de citocinas pro-



inflamatorias a través de la activación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ (Tracey 2002). Este reflejo antiinflamatorio se ha investigado principalmente a nivel sistémico, de manera que el bazo juega un papel importante al detectar la inflamación y reducir la liberación de algunas citocinas proinflamatorias por los macrófagos. También se ha propuesto que el reflejo podría funcionar a nivel del intestino (Figura 4), como se describirá posteriormente.

Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

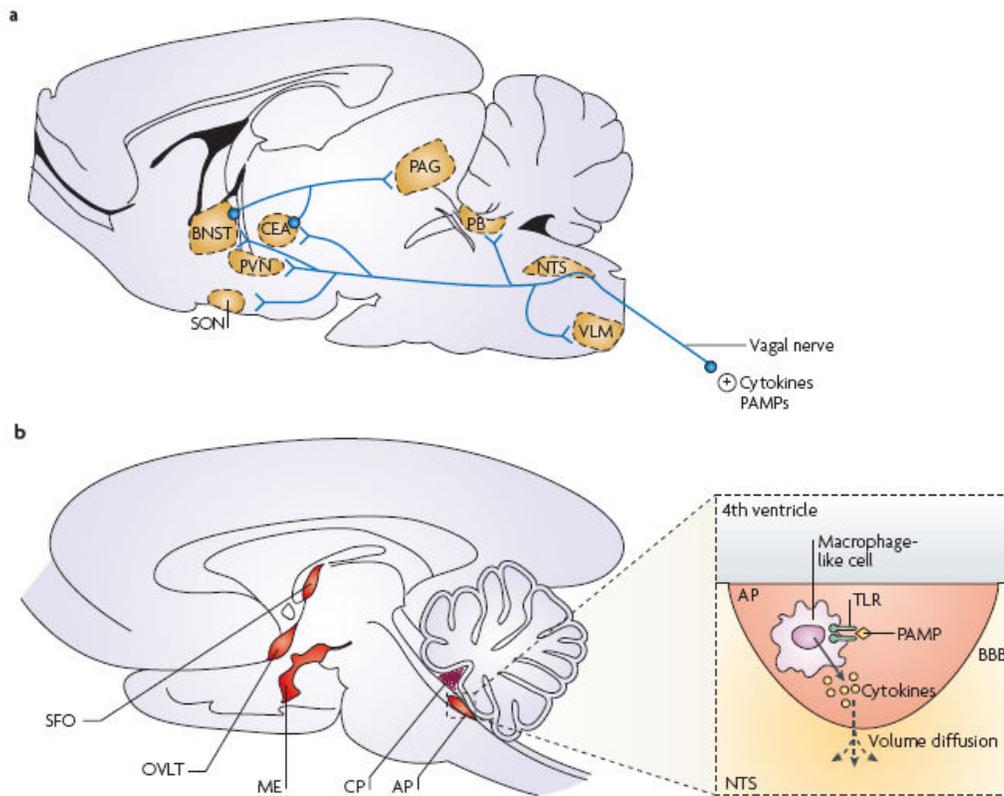


Figura 3. Vías de comunicación de la información inmune hasta el cerebro. a) Vía neural. La información del sistema inmune en la periferia puede viajar hacia el cerebro a través del nervio vago. Éste puede detectar moléculas como citoquinas o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y transmitir esta información al núcleo del tracto solitario (NTS) que se encuentra en el tallo cerebral. Éste, a su vez, puede transmitir la información hacia otros sitios del cerebro para poder modular la inflamación como la médula ventrolateral (VLM), el núcleo parabraquial (PB), la sustancia gris periacueductal (PAG), el núcleo central de la amígdala (BNST), el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y el núcleo supraóptico (SON). b) Vía humoral. Los órganos circunventriculares como el órgano subfornical (SFO), el órgano vascular de la lámina terminal (OVLT), la eminencia media (ME), el plexo coroideo (CP) y el área postrema (AP) poseen células similares a los macrófagos que tienen receptores para PAMPs como receptores tipo toll (TLR). A partir de la detección y señalización de estas moléculas, estas células pueden producir citoquinas que difunden y señalizan hacia el resto del cerebro. Tomado de (Dantzer et al. 2008).

Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

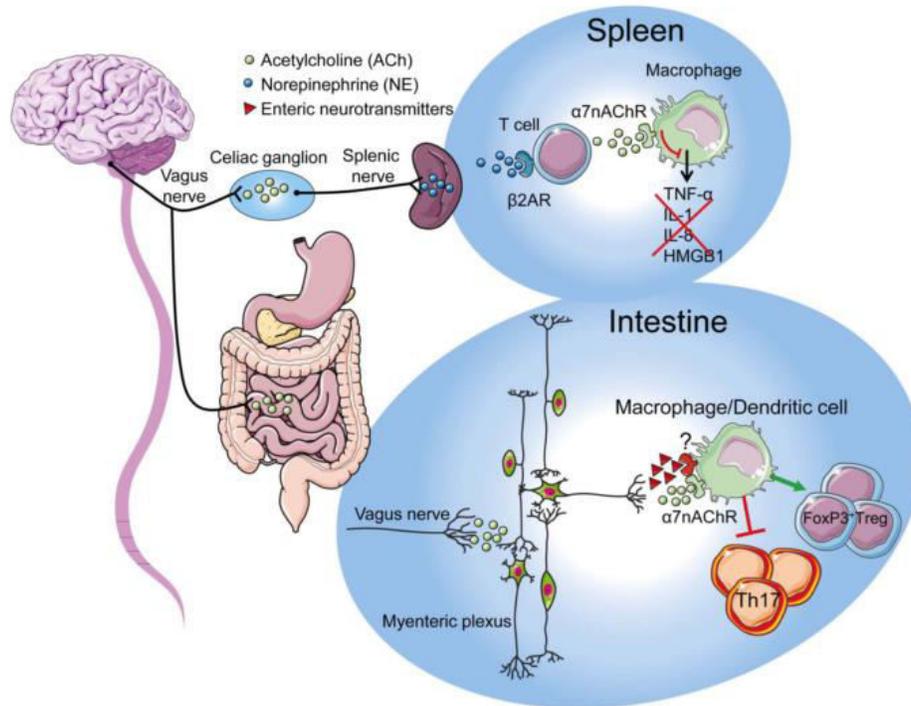


Figura 4. La vía colinérgica antiinflamatoria. El nervio vago es capaz de señalizar hacia el ganglio celiaco utilizando a la acetilcolina (ACh) como neurotransmisor, de modo que el nervio esplénico se active, liberando norepinefrina (NE) en las terminales del bazo. La norepinefrina señala hacia los receptores β adrenérgicos de las células T, estimulando la producción de acetilcolina que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos del bazo. Por otro lado, se propone que esta vía podría funcionar en el intestino a través de la señalización del vago hacia las neuronas entéricas del plexo mientérico. En este caso, los neurotransmisores entéricos podrían modular la actividad de los macrófagos o células dendríticas del intestino, de modo que se estimule la producción de células T reguladoras y se inhiba la proliferación de células proinflamatorias como los linfocitos Th17. Tomado de Matteoli, 2013.



3. La infección por Salmonella para estudiar la interacción intestino-cerebro en un contexto circadiano.

Las infecciones bacterianas tienen componentes circadianos.

Como se describió anteriormente, el sistema inmune tiene ritmos circadianos en algunos de sus componentes de manera basal, lo que podría repercutir en el desarrollo de infecciones. Además de esto, resulta interesante investigar si la respuesta inmune que se monta ante un patógeno también depende del momento del ciclo circadiano en el que se infecte a un organismo. Un estudio realizado por Gibbs et. al. reporta que la respuesta ante el patógeno *Streptococcus pneumoniae* en ratones es diferente dependiendo de la hora de inoculación, ya que si se infecta a los ratones al inicio de la fase de actividad (ZT12) existe una menor cantidad de bacteria en el pulmón así como una menor diseminación de las bacterias hacia la sangre en comparación con el inicio de la fase de descanso (ZT0) después de 48 horas de la inoculación. Estas diferencias son debidas a un mayor reclutamiento de neutrófilos al pulmón durante la fase de actividad, lo que a su vez está modulado por las variaciones circadianas de corticosterona (Gibbs et al. 2014). Estos datos sugieren que la respuesta ante bacterias como *S. pneumoniae* es diferente dependiendo de la hora de inoculación y que esta respuesta puede estar modulada a diferentes niveles.

La infección por Salmonella presenta ritmos circadianos.

Otro estudio reciente, realizado por Bellet et. al. demostró que tras infectar ratones con *Salmonella typhimurium*, los ratones presentaban una respuesta inmune diferente dependiendo de la hora de inoculación. Se observó que al infectar a los ratones en su fase de descanso (ZT4), éstos presentaban una mayor cantidad de bacteria en el colon, así como un mayor índice inflamatorio en este tejido con respecto a los ratones inoculados en su fase de actividad (ZT16). Además, observaron que la producción de citocinas como TNF- α era mayor al inocular a los



animales en su fase de descanso con respecto a la fase de actividad, sugiriendo una inflamación mayor en este periodo. De manera importante, se demostró también que las diferencias circadianas en la cantidad de bacteria en el intestino no eran dependientes de la hora de sacrificio sino únicamente de la hora de inoculación, ya que si se sacrificaba al animal en un periodo diferente al periodo de inoculación, esta diferencia se mantenía. Estos resultados recalcan la importancia del sistema circadiano en la respuesta ante la infección por Salmonella, sin embargo, no es claro si el sistema nervioso tiene un papel en modular estas diferencias.

El sistema nervioso autónomo puede detectar la respuesta inflamatoria intestinal.

Como se describió previamente, existe evidencia de que la parte aferente del reflejo antiinflamatorio vagal podría tener una importancia en la modulación de la respuesta inflamatoria intestinal. El intestino es una estructura que se encuentra ampliamente innervada, tanto por el sistema simpático como por el parasimpático (Costes et al. 2013; Furness 2012). Se han realizado algunos estudios que sugieren que las aferentes vagales detectan la inflamación en diferentes modelos de inflamación intestinal. Por ejemplo, se ha observado que tras inducir ileo postoperatorio en ratas (Cailotto et al. 2012) se observa la activación de diferentes áreas del cerebro como el núcleo del tracto solitario, y que esta activación se pierde si se realiza una denervación intestinal. También se ha observado la activación del núcleo del tracto solitario y otras áreas cerebrales al inducir inflamación gastrointestinal por distintos patógenos, ya sea *Campylobacter jejuni* (Gaykema, 2004; Goehler, 2005), *Citrobacter rodentium* (Lyte et al. 2006) o *Salmonella sp.* (Riley et al. 2013) Estos estudios sugieren que el nervio vago es capaz de detectar la inflamación intestinal pero no es claro si el reflejo antiinflamatorio en su parte eferente también es funcional en el intestino.



La infección por Salmonella como modelo para estudiar la respuesta inmune intestinal.

Salmonella enterica es una bacteria gram-negativa enteropatógena con una gran relevancia epidemiológica, causante de enfermedades como gastroenteritis o fiebre tifoidea. Este patógeno se transmite por ingestión de agua o alimentos contaminados y puede infectar a diferentes especies de mamíferos como ratas, ratones y humanos. Utilizar a *Salmonella enterica* como modelo de infección es útil porque puede producir tanto una infección local (gastroenteritis) como una infección multiorgánica dependiendo del tiempo, la cepa inoculada y el hospedero (Gal-Mor et al. 2014; Santos et al. 2001). *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (en adelante referida como *S. typhimurium*), la subespecie utilizada en este estudio, infecta predominantemente a roedores y tiene pocos efectos en la salud humana, cuestión que resulta conveniente para su trabajo en el laboratorio.

Cinética de infección por Salmonella entérica (S. enterica)

S. enterica es capaz de invadir diversos órganos del hospedero dependiendo de diversos factores. En ratas, se ha observado que desde las dos horas después de la inoculación oral, *S. enterica* es capaz de unirse a la mucosa gastrointestinal, principalmente a los enterocitos del íleon distal, ciego y colon (Havelaar et al. 2001). Posteriormente, comienza su internalización hacia la submucosa a través de los enterocitos o de las células M de las placas de Peyer (Figura 5). Una vez en la submucosa, es fagocitada por células inmunes como los macrófagos o los neutrófilos. Los macrófagos juegan un papel importante en la infección porque, a través de distintos factores de virulencia, *S. enterica* es capaz formar una vacuola dentro de ellos desde la cual puede reproducirse y evadir la detección por el sistema inmune. Una vez dentro de los macrófagos, *S. enterica* puede migrar hacia los nódulos mesentéricos linfáticos a través del sistema linfático. En ratas, se ha reportado que se puede detectar su presencia en nódulos linfáticos entre 1 y



3 días después de la inoculación (Rodenburg, Bovee-Oudenhoven, et al. 2007; Rodenburg, Keijer, et al. 2007; Thygesen et al. 2000). Posteriormente, *S. enterica* puede viajar a través de la sangre hacia otros órganos como el bazo o el hígado, donde puede infectar a otras células como los linfocitos B. Algunos reportes indican que la invasión del bazo se puede detectar entre el primer y tercer día después de la inoculación, mientras que en el hígado se ha detectado entre 1 y 6 días después de la inoculación (Rodenburg, Bovee-Oudenhoven, et al. 2007; Rodenburg, Keijer, et al. 2007; Thygesen et al. 2000). Una vez que la infección es multiorgánica la liberación de citocinas en respuesta al patógeno puede desencadenar eventos como la fiebre.

De esta manera, *S. enterica* puede provocar desde una gastroenteritis hasta una infección sistémica y fiebre (fiebre tifoidea), dependiendo del tiempo después de su ingestión, de qué tan virulenta sea la cepa y de qué tanta resistencia oponga el sistema inmune del hospedero (de Jong et al. 2012; Behnsen et al. 2015; Mastroeni & Grant 2011; Watson & Holden 2010).

Las respuestas del sistema inmune innato ante este patógeno son inicialmente dadas por los enterocitos, los macrófagos residentes y las células dendríticas. Éstas detectan algunas moléculas presentes en *S. enterica* como el LPS, la flagelina o DNA bacteriano utilizando receptores tipo Toll (como TLR4, TLR5 y TLR9 respectivamente) y producen algunas citocinas en consecuencia. La activación de estos receptores por *S. enterica* promueve la liberación local de citocinas como IL-1 β , IL-18 e IL-23, que a su vez reclutan a otras células del sistema inmune como los neutrófilos (principales células del sistema inmune innato que eliminan a *S. enterica*) de modo que éstos ayuden a eliminar a la bacteria (Broz et al. 2012; Behnsen et al. 2015).

De acuerdo a lo descrito previamente, las moléculas producidas por el sistema inmune desde las etapas tempranas de la infección (por ejemplo, citocinas), así como las mismas moléculas presentes en *S. enterica* (por ejemplo, LPS), podrían



Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

ser detectadas por el sistema nervioso a través de distintas vías. De este modo, el cerebro y, de manera importante, el núcleo supraquiasmático, podrían ser capaces de modular la respuesta del hospedero ante una infección con *S. enterica*.

Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

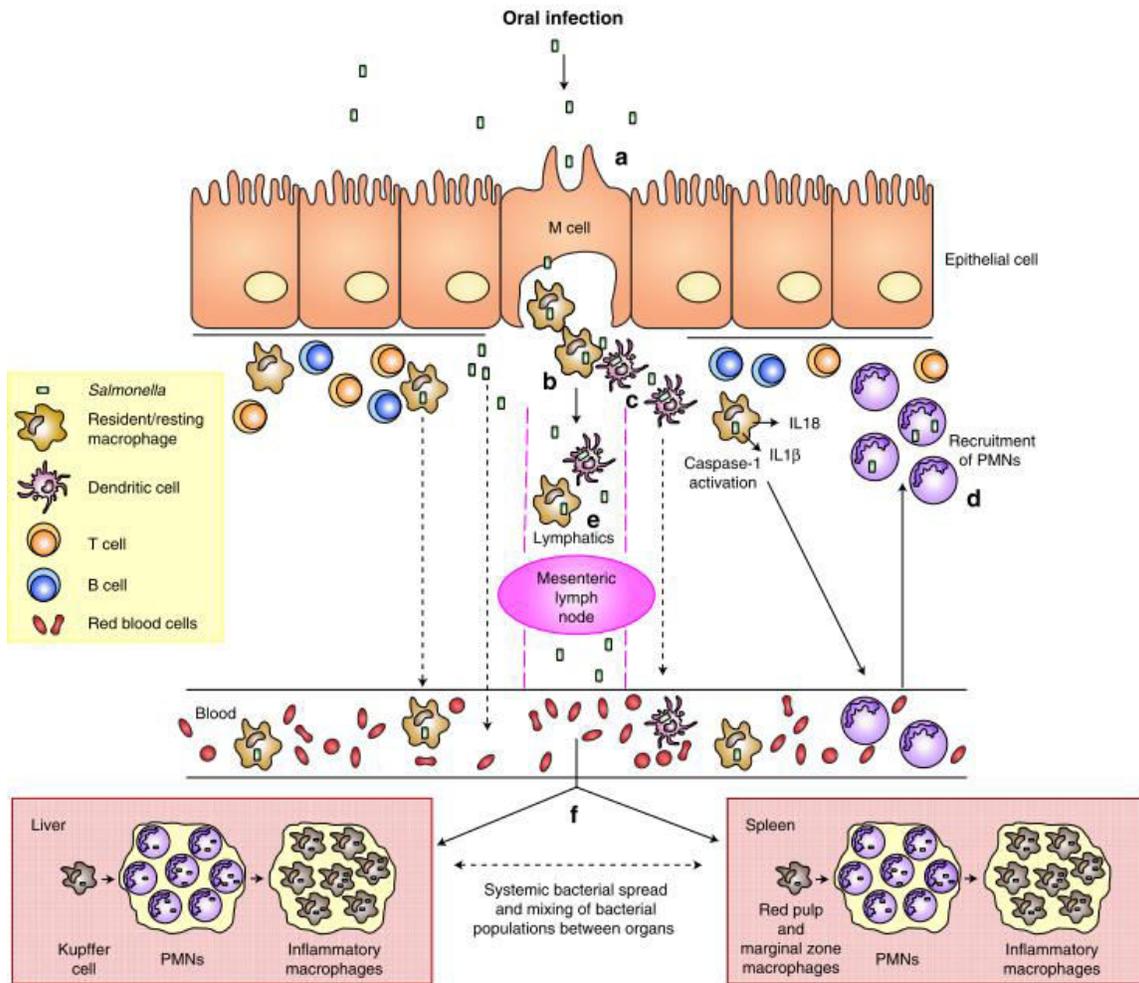


Figura 5. Invasión de Salmonella y diseminación hacia los órganos. Tras su ingesta oral, *S. entérica* llega hasta el epitelio intestinal y se internaliza hacia la submucosa a través de las células M de las placas de Peyer. Ahí es detectada por las células del sistema inmune como los macrófagos y las células dendríticas, quienes secretan citocinas como IL-18 e IL-1 β para atraer a más células inmunes como los polimorfonucleares (PMNs) para combatir la infección. *S. entérica* es capaz de residir dentro de algunas de las células inmunes a través de diversos mecanismos de patogenicidad. Desde la submucosa también puede viajar por la linfa hasta los nódulos linfáticos mesentéricos, donde se reproduce, o migrar hacia la sangre, diseminándose hacia órganos como el hígado y el bazo, donde puede infectar a más células inmunes. Modificado de Mastroeni & Grant 2011.



4. Hipótesis

La invasividad de la infección por *Salmonella enterica typhimurium* en ratas presenta variaciones circadianas que pueden ser moduladas por el núcleo supraquiasmático.

5. Objetivos

- Determinar si la invasividad de *Salmonella typhimurium* en ratas presenta diferencias dependiendo de la hora de inoculación (día/noche).
- Observar la activación del núcleo supraquiasmático y el núcleo de tracto solitario en respuesta a la infección por *Salmonella typhimurium* en el día y en la noche.

6. Metodología

Estrategia experimental.

Para determinar si la infección por *S. typhimurium* en ratas presenta diferencias circadianas, se realizaron experimentos en los que se inoculó a las ratas con *S. typhimurium* en dos puntos temporales, ya sea dos horas después del inicio del periodo de luz (ZT2) o dos horas después del inicio del periodo de oscuridad (ZT14). Después de la infección, las ratas fueron sacrificadas 8, 24, 60 y 72 horas después de la inoculación y se obtuvo tejido intestinal (íleon, ciego, colon) para confirmar la infección mediante el conteo en placa. También se obtuvo el cerebro y se procesaron cortes de éste mediante inmunohistoquímica para c-fos, un marcador de activación neuronal, de modo que se pudiera evaluar la actividad del núcleo supraquiasmático y el núcleo del tracto solitario ante la infección.



Sujetos experimentales.

Se utilizaron ratas Wistar macho de 260 ± 10 g mantenidas en un ciclo de 12 hrs de luz y 12 de oscuridad (7:00 am se enciende la luz y 7:00 pm se apaga), con comida y agua *ad libitum*. Se utilizó un total de 77 ratas, de las cuales 24 fueron administradas con solución salina y 53 con suspensión de *S. typhimurium*, de éstas últimas, dos fueron descartadas debido a que presentaban cantidades exageradas de recuperación de la bacteria. La cantidad total de ratas infectadas se determinó a partir de estudios previos (Guerrero-Vargas et al. 2014) y se obtuvo a partir de diversos experimentos; cuyas especificaciones pueden encontrarse en la Figura Suplementaria 1.

Cepa infecciosa.

Se utilizó como agente infeccioso la cepa RC39 de *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (en adelante referida como *S. typhimurium*) donada por Dr. Rafael Camacho del Instituto de Investigaciones Biomédicas. La cepa fue aislada de un paciente y ha sido preservada por congelación, tiene alta resistencia a ampicilina (1mg/mL), característica que fue aprovechada para crecerla en un cultivo selectivo. La cepa corresponde a una *S. typhimurium* patógena que puede ocasionar fiebre tifoidea en roedores pero tiene una baja virulencia en humanos, causando gastroenteritis. Cabe destacar que todo el material de laboratorio o superficies que haya tenido contacto con el patógeno fueron desinfectadas y tratadas de acuerdo a las buenas prácticas de microbiología. Igualmente, los animales infectados fueron dispuestos de acuerdo a las recomendaciones para un patógeno de bioseguridad nivel 2.

Infección.

El día anterior a los experimentos se tomó una colonia, se suspendió en 5 mL de medio de cultivo Difco Nutrient Broth® con 1 mg/mL de ampicilina y NaCl 0.9%. Se dejó incubando durante 8 hrs y posteriormente se preparó un cultivo secundario tomando 200 μ L del cultivo primario y resuspendiéndolos en 10 mL de medio de



cultivo. Se incubó toda la noche. Con este método, se obtuvieron 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. Se centrifugó el medio y se resuspendieron las bacterias en vehículo (NaCl 0.9% NaHCO₃ 3%) para su administración. Se administraron 0.5 mL de la suspensión bacteriana (dosis 10^9 UFC/kg de rata) mediante una cánula intragástrica. Para confirmar la cantidad de *S. typhimurium* inoculada, se realizaron diluciones seriadas de la suspensión inoculada y se plaquearon 100 μ L de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} . Se realizó el conteo de cada placa y se determinó el número de UFC/mL promediando lo obtenido para cada dilución (solo se tomaron en cuenta las placas que contenían entre 10 y 250 UFC). En la Figura S1 se muestra la cantidad exacta de UFC/mL que se inoculó en cada experimento.

Obtención de muestras.

Pasando 8, 24, 60 y 72 horas después de la inoculación, se anestesió al animal con una sobredosis de pentobarbital y se realizó la perfusión intracardiaca con solución salina 0.9% seguido de paraformaldehído 4% en buffer de fosfatos (0.01M pH=7.4). Se obtuvieron muestras de sangre, cerebro, médula espinal, intestino, hígado y bazo que se procesaron como se menciona a continuación.

- Sangre: Se obtuvo por punción cardiaca previo a la perfusión del animal. Se recolectó en tubos con EDTA que se colocaron en hielo hasta su centrifugación (7000 rpm, 8 min) para obtener el plasma. El plasma se procesó posteriormente para la cuantificación de citocinas.
- Cerebro: Después de la perfusión, se decapitó a la rata y se extrajo el cerebro. Éste se colocó en paraformaldehído por una noche, seguido de dos noches en sacarosa 30% para ser cortado en un criostato en rebanadas de 40 μ m y ser procesado por inmunohistoquímica para c-fos.
- Intestino: Previo a la perfusión con paraformaldehído, se obtuvo una sección de íleon, ciego y colon. Se extrajeron aproximadamente 7 cm de íleon y colon proximales al ciego, se lavaron con solución salina fría para eliminar restos de heces y se separaron en 3 porciones. El ciego se extrajo



completamente e igualmente se separó en tres porciones. La primera porción de las muestras se colocó en paraformaldehído para procesarse para inmunohistoquímica y microscopía. La segunda porción se guardó a -80°C para procesarse posteriormente para cuantificar citocinas. La tercera porción se procesó para realizar la confirmación de la infección por conteo en placa.

- Hígado y bazo: Previo a la perfusión con paraformaldehído, se obtuvo una muestra del lóbulo lateral derecho del hígado y el bazo. Éstos fueron separados en tres porciones que fueron procesadas al igual que el intestino.
- Nódulos linfáticos mesentéricos: Previo a la perfusión con paraformaldehído, se disectaron los nódulos linfáticos mesentéricos, se limpiaron de la grasa circundante y se tomó la mitad de los nódulos para realizar el conteo en placa.

Homogenización y conteo en placa.

Para realizar la cuantificación de *S. typhimurium* viable en el tejido de intestino, hígado, bazo y nódulos linfáticos, se pesaron las muestras de tejido obtenido y se homogenizaron en 500 μL de PBS (buffer de fosfatos 0.01M pH=7.4, NaCl 0.9%) con Tritón al 3%. Se plaquearon 50 μL del homogenizado en placas de agar con el medio de cultivo descrito anteriormente. Se incubaron las cajas toda la noche a 37°C y posteriormente se realizó el conteo de las colonias y se calculó la cantidad de UFC/g de tejido para cada órgano. Cabe mencionar que las ratas administradas con vehículo no presentaron *S. typhimurium* en el intestino en ninguna condición.

Cuantificación de citocinas en sangre e intestino.

Las muestras del plasma obtenido se procesaron mediante ELISA para cuantificar su contenido de TNF- α de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Invitrogen®). En cuanto al intestino, se pesaron partes iguales de cada sección de intestino



(íleon, ciego y colon) para obtener aprox. 600 µg de muestra de intestino por rata. Se homogenizaron en 600µL de PBS con coctel inhibidor de proteasas (Roche®), se centrifugaron las muestras durante 7 minutos a 8,000 rpm y el sobrenadante se procesó por ELISA de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Inmunohistoquímica del cerebro.

Se realizó la inmunohistoquímica para c-fos, un marcador de activación neuronal, de los cortes de cerebros de las regiones correspondientes al núcleo supraquiasmático, núcleo del tracto solitario, área postrema y núcleo paraventricular. Para esto se incubaron los cortes en el anticuerpo primario vs c-fos diluido 1:40000 en PBSGT (PBS con suero de cabra y tritón al 1%), durante 72 horas, a 4°C con agitación suave y continua. Posteriormente se lavaron los cortes tres veces con PBS durante cinco minutos y se incubaron en anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo diluido 1:500 en PBSGT, durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y continua. Nuevamente se lavaron los cortes en PBS durante cinco minutos por triplicado y se incubaron los cortes en el complejo AB (1:4500, Vector Lab ®) Se lavaron los cortes en PBS durante cinco minutos y se realizó el revelado. Éste consistió en incubar los cortes en 50 mL de PBSGT con 6 µL de peróxido de hidrógeno glacial, 300 µL de una solución de diaminobencidina (DAB) (5mg/ml) 1 mL de solución de níquel. Se realizó el revelado hasta observar una coloración adecuada. Finalmente, se detuvo la reacción lavando los cortes en PBS. Posteriormente los cortes fueron montados en portaobjetos, deshidratados (2 minutos en las siguientes soluciones: agua, etanol 70% etanol 90% y etanol 100%, xilol) y cubiertos con Entellan® para su observación al microscopio.

Conteo de células positivas para c-fos.

Para realizar la cuantificación de células positivas para c-fos, se tomaron fotografías con una cámara Nikon acoplada a un microscopio, Se tomaron las fotografías de 3 cortes representativos de cada animal del núcleo



supraquiasmático y del núcleo de tracto solitario con un aumento de 4X. Las imágenes fueron procesadas en el programa ImageJ. Se sustrajo el fondo, se estableció un límite y se contaron las partículas con un tamaño de 40 a 200 píxeles de manera bilateral en cada corte. Se reportó el promedio de los tres cortes para cada animal y se realizó el análisis estadístico.

Inmunohistoquímica del intestino.

Se realizó inmunohistoquímica del intestino para detectar la localización de la bacteria en el tejido. Para esto, se fijó el tejido en paraformaldehído al 4% hasta su procesamiento. Los segmentos del tejido se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 5µm para colocarse en portaobjetos recubiertos de TESPA®. Posteriormente se desparafinizaron mediante la colocación de éstos en una serie de soluciones (10 minutos en las siguientes soluciones: xilol, xilol-etanol [1:1], etanol 100%, etanol 96%). Seguido de esto, se realizó la recuperación antigénica colocando las laminillas en solución de recuperación de antígeno (EDTA 1 mM, Tris-base 10 mM, Tween 0.05%, pH=9.0) y calentando a baño maría durante 5 min a 50°C. Se dejó enfriar durante 30 min. y se realizaron dos lavados con PBS (0.01M pH=7.4). Posteriormente se permeabilizó el tejido, para esto se incubaron los cortes en una solución de NP40 al 0.2% en PBS durante 10 minutos en cámara húmeda. Se lavaron dos veces las laminillas con PBS. Se realizó el bloqueo de peroxidasas endógenas incubando los cortes en H₂O₂ al 1% en PBS durante 15 min. Las laminillas se lavaron dos veces con PBS y se procedió a incubar los cortes con un anticuerpo primario contra LPS de *Salmonella enterica* hecho en conejo (Novus Biologicals®) a una dilución de 1:500. Se incubó en cámara húmeda a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se lavaron las laminillas con PBS-Tween 0.2% por duplicado y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti conejo biotinilado, 1:500 Jackson Immunoresearch®) durante 90 min a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron dos veces con PBS- Tween y se incubaron con complejo AB (1:500, Vector Lab®) durante 1 hr a temperatura ambiente. Se lavaron dos veces las laminillas con PBS. Se realizó el revelado de



Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

la misma manera descrita para los cortes de cerebro. Se realizaron dos lavados con PBS-Tween y se tiñeron los cortes con hematoxilina de Hill. Se enjuagaron los cortes con agua destilada y se sumergieron en solución de agua amoniacal (NH_4OH 0.6% en agua destilada) para el viraje del pH de la hematoxilina. Se deshidrataron los cortes y se cubrieron para observar al microscopio de la misma manera que se describió para los cortes de cerebro.



7. Resultados

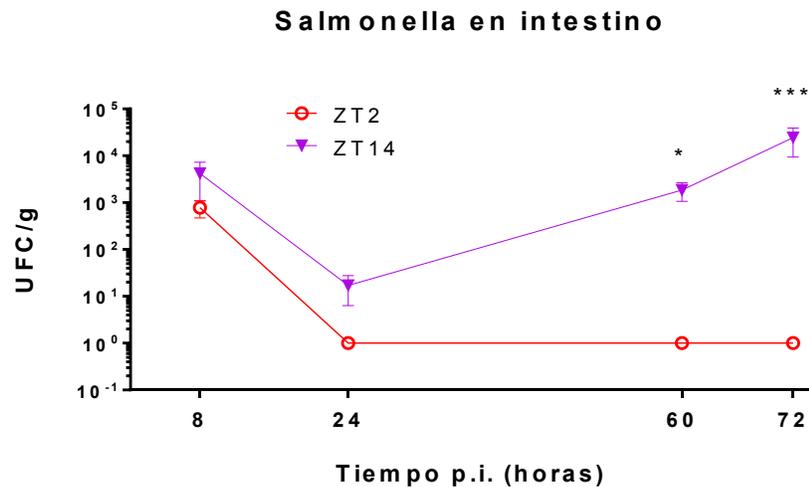
Cinética de infección de las ratas inoculadas en el día (ZT2) y en la noche (ZT14).

Como puede observarse en la Figura 6, a las 8 horas post-inoculación no se observaron diferencias en la cantidad de bacteria recuperada del intestino en los dos tiempos. A las 24 horas, se advirtió una disminución en la cantidad de bacteria recuperada del intestino en ambos grupos. Por otra parte, al evaluar la cantidad de bacteria en el tejido intestinal después de 72 horas post-inoculación se observó una mayor cantidad de bacterias recuperadas del intestino en las ratas inoculadas en la noche con respecto a las del día (prueba Mann Whitney, $p < 0.01$); mientras que las ratas inoculadas durante el día no presentan *S. typhimurium* en el intestino (o una cantidad por debajo del límite de detección de este estudio, 5 UFC/g), las ratas inoculadas en la noche presentan una gran cantidad de bacterias en el íleon, ciego y colon (Figuras 6, S1, S2 y S3). Cabe mencionar que la infección en las ratas infectadas en ZT2 fue corroborada por la presencia de *S. typhimurium* en los nódulos linfáticos mesentéricos (Figura 7).

Al analizar la cantidad de *S. typhimurium* en el hígado y bazo se observó que la mayoría de las ratas infectadas no tenían *S. typhimurium* en estos tejidos (Figuras S5 y S6), sugiriendo que antes de las 72 horas, la infección no alcanza a ser sistémica. Al evaluar la cantidad de *S. typhimurium* en las ratas a las 60 horas (Figura 6), que corresponde a una fase contraria a la fase en la que se inoculó a las ratas (es decir, las ratas inoculadas en el día fueron evaluadas en la noche y las ratas inoculadas en la noche fueron evaluadas en el día) se observó que esta tendencia se mantiene (prueba Mann Whitney; $p < 0.05$). Esto sugiere que las diferencias en la cantidad de *S. typhimurium* en el intestino están dadas por la hora en que se inoculó al animal y no la hora en que se sacrificó. Cabe destacar que no se encontró *S. typhimurium* en las ratas administradas con vehículo en ninguna condición y que no se observaron signos de enfermedad como fiebre,



falta de apetito y piel erizada en ninguna de las ratas infectadas.



*Figura 6. Cantidad de S. typhimurium en el intestino. Se muestra la media y el error estándar de la cantidad de S. typhimurium recuperada del intestino (íleon, ciego y colon) de las ratas inoculadas en el día (ZT2) y en la noche (ZT14) en los cuatro puntos temporales. En las Figuras Suplementarias 2, 3 y 4 se muestra la cantidad de bacteria recuperada de cada porción del intestino. *** p< 0.001, * p<0.05. ZT2: 8 hrs n=12, 24 hrs n=5, 60 hrs n=3, 72 hrs n=6; ZT14: 8 hrs n=6, 24 hrs n=5, 60 hrs n=6, 72 hrs n=8*

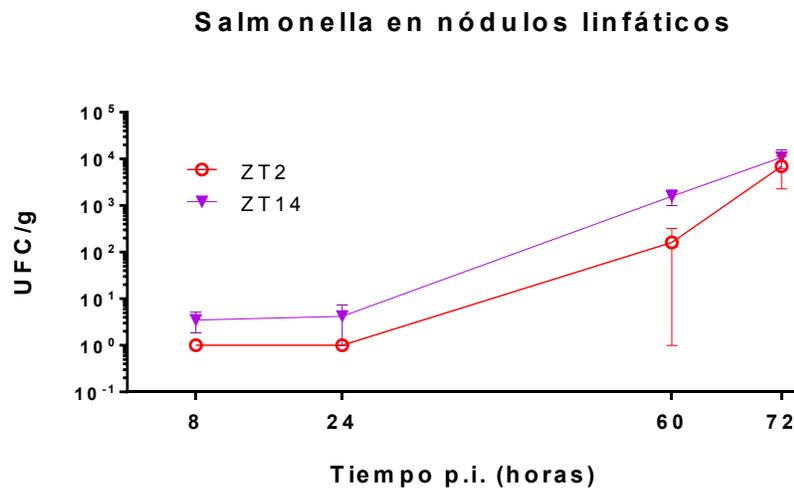


Figura 7. Cantidad de S. typhimurium en nódulos linfáticos. Se muestra la media y el error estándar de la cantidad de Salmonella recuperada de los nódulos linfáticos mesentéricos de las ratas inoculadas en el día (ZT2) y en la noche (ZT14) en los cuatro puntos temporales. ZT2: 8 hrs n=3, 24 hrs n=5, 60 hrs n=3, 72 hrs n=6; ZT14: 8 hrs n=4, 24 hrs n=5, 60 hrs n=6, 72 hrs n=8

Actividad del núcleo supraquiasmático después de 72 horas de infección por Salmonella.

Se realizaron inmunohistoquímicas para algunos cortes de cerebro provenientes de ratas sacrificadas después de 8, 24, 60 y 72 horas de la inoculación, aunque no se observaron diferencias claras en la expresión de c-fos, un marcador de activación neuronal, de manera cualitativa. Debido a que la diferencia más grande en la invasividad de *S. typhimurium* se observó a las 72 horas, únicamente se cuantificó la cantidad de c-fos en el núcleo supraquiasmático en las ratas sacrificadas en este tiempo. Debido al manejo no óptimo de algunas muestras del tejido, se descartaron las muestras de una rata inoculada en ZT2 y de dos ratas inoculadas en ZT14; el tamaño de muestra final para cada grupo se especifica en



Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

la figura 8 y 9. Se cuantificó la cantidad de c-fos en cortes de tejido de cinco ratas, una muestra representativa del total de ratas inoculadas y sacrificadas en este tiempo. Se observó una ligera disminución en la cantidad de c-fos en el núcleo supraquiasmático de las ratas infectadas en ZT2 con respecto a las administradas con vehículo, aunque ésta no es significativa. En el caso de las ratas infectadas en ZT14, no se observaron diferencias en la actividad del núcleo supraquiasmático respecto al control (Figura 8).

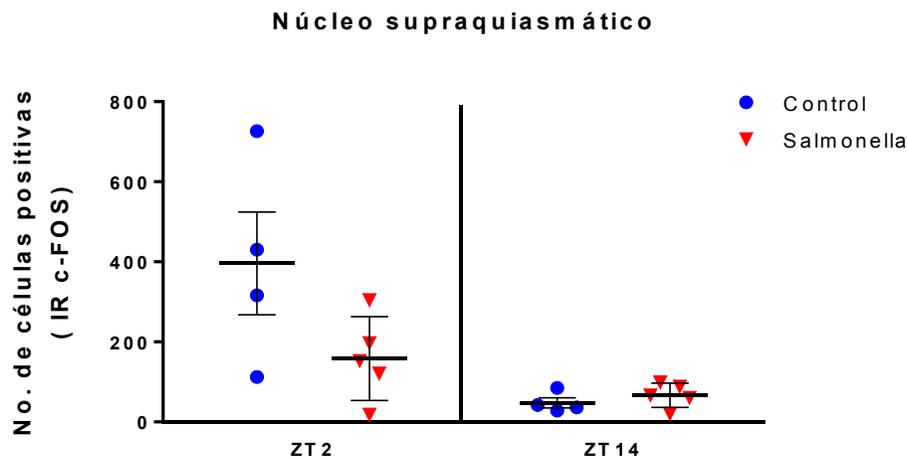


Figura 8. Cantidad de células positivas para c-fos en el núcleo supraquiasmático. Se muestra el conteo bilateral de células inmunopositivas de ratas administradas con S. typhimurium o vehículo (control) en el día (ZT2) y en la noche (ZT14), con la media y el error estándar para cada grupo. ZT2: control n=4 S. typhimurium n=5; ZT14: control n=4 S. typhimurium n=5

Actividad del núcleo del tracto solitario después de 72 horas de infección por S. typhimurium.

Igualmente se analizó la cantidad de c-fos en el núcleo del tracto solitario de las



ratas infectadas y los controles después de 72 horas de la administración de *S. typhimurium* o vehículo. Como se observa en la Figura 9, existe mucha variabilidad en los datos y no hay diferencias entre los grupos.

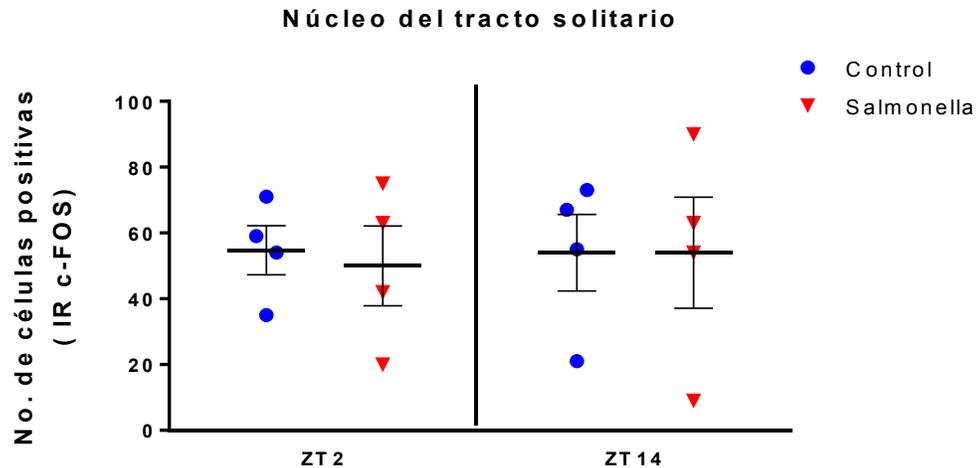


Figura 9. Cantidad de células positivas para c-fos en el núcleo del tracto solitario. Se muestra el conteo bilateral de células inmunopositivas de ratas administradas con S. typhimurium o vehículo (control) en el día (ZT2) y en la noche (ZT14), con la media y el error estándar para cada grupo. n=4 para todos los grupos.

Actividad de otras áreas del hipotálamo después de la infección por *S. typhimurium*.

Se evaluó cualitativamente la cantidad de c-fos en diversos núcleos cerebrales como el núcleo paraventricular del hipotálamo, el área postrema, entre otros. Se observó que en algunos casos, las ratas infectadas muestran una mayor activación de estos núcleos que las ratas control, sin embargo, la respuesta es muy variable de modo que no se observa un patrón claro de activación inducido por *S. typhimurium* (datos no mostrados).



Citocinas en sangre e intestino

Se analizó la cantidad de TNF- α en la sangre e intestino de las ratas controles o infectadas después de 72 horas. La cantidad de TNF- α en la sangre tanto de los controles como de las ratas infectadas en ambos puntos temporales fue nula o menor a los límites de detección del kit utilizado (4 pg/mL). La cantidad de TNF- α en el intestino sí fue detectable y se muestra en la Figura 10. Se observó un efecto de la hora del día en la cantidad de TNF (ANOVA de 2 vías $p < 0.05$), además las ratas infectadas en ZT2 tienen una respuesta de TNF mucho mayor respecto a las ratas administradas con *S. typhimurium* o vehículo en ZT14 (post hoc Tukey $p < 0.05$).

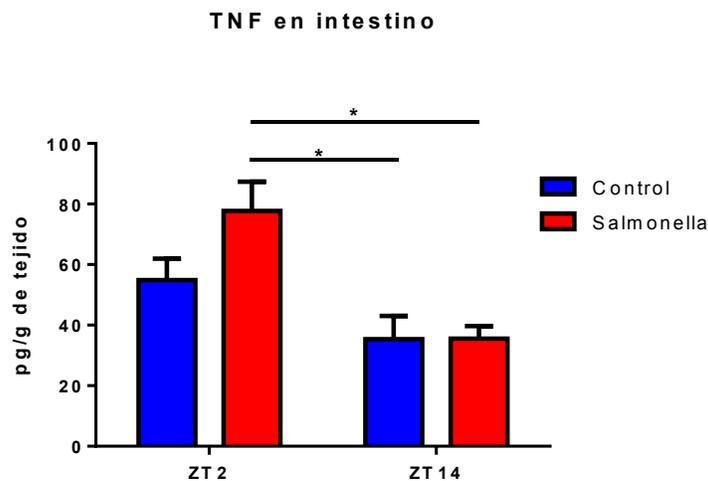


Figura 10. Cantidad de TNF- α en el intestino. Se muestra la cantidad de TNF- α en pg/g de tejido intestinal de ratas administradas con *S. typhimurium* o vehículo (control) en el día (ZT2) y en la noche (ZT14). Se muestra la media y el error estándar para cada grupo. * $p < 0.05$. ZT2: control $n = 4$ *S. typhimurium* $n = 5$; ZT14: control $n = 4$ *S. typhimurium* $n = 5$



Localización de S. typhimurium en el intestino.

Se realizó inmunohistoquímica para localizar a la bacteria en el intestino. La metodología utilizada no permitió discernir entre la microbiota y *S. typhimurium* debido a que se observó marca tanto en las ratas infectadas como en las controles, probablemente debido a una reactividad cruzada del anticuerpo con el LPS de otras enterobacterias. Se muestran fotografías representativas en la Figura S8.

8. Discusión

Cinética de infección de las ratas inoculadas en el día (ZT2) y en la noche (ZT14).

Como se describió en los resultados, la cinética de la infección es diferente dependiendo de la hora de inoculación pero este efecto solo puede observarse después de algunos días (60 y 72 hrs). Resulta interesante que después de 24 horas la cantidad de *S. typhimurium* disminuye hasta niveles no detectables, que en el caso de las ratas inoculadas en la noche incrementan de nuevo a las 60 y 72 horas. Esto sugiere que la mayoría de la bacteria es eliminada por el sistema inmune innato pero permanece una cantidad no detectable de bacteria que se reproduce posteriormente si los animales fueron infectados en la noche. Dos estudios recientes apoyan esta hipótesis, en ellos se infectó oralmente a ratones con una mezcla de varias cepas de *S. enterica* con un fenotipo idéntico pero una marca genética a modo de “código de barras” para poder rastrear su comportamiento. Se observó que inicialmente, muchas de las poblaciones son eliminadas y solamente una población predomina y se reproduce (Lim et al. 2014; Maier et al. 2014).

Por otra parte, en los nódulos linfáticos se observó que la cantidad de bacteria aumenta con el tiempo, a pesar de que en las ratas inoculadas en el día ya no hay bacteria en el intestino, en los nódulos esta cantidad sigue siendo elevada al igual que en las ratas inoculadas durante la noche. Se ha reportado que desde las 2



horas, la bacteria puede encontrarse en los nódulos linfáticos (Havelaar et al. 2001). Voedisch et al. (2009) ha reportado que los nódulos linfáticos pueden funcionar como reservorio de *S. enterica* y que, además, la presencia de la bacteria en los nódulos protege al organismo de infección en el hígado y bazo. En conjunto estos datos apuntan a que la bacteria se traslocó hacia los nódulos desde las primeras horas y se replicó en este tejido.

Activación neuronal inducida por *S. typhimurium*

Debido a que se observaron diferencias circadianas en la infección y que específicamente el núcleo supraquiasmático podría tener influencia directa en el sistema inmune (Guerrero-Vargas et al. 2014), se analizó la actividad neuronal del núcleo supraquiasmático y de algunas áreas involucradas en la transmisión de información periférica hacia el núcleo supraquiasmático. Como se puede observar en los resultados, no se observó un cambio en la activación neuronal después de 72 hrs de infección con *S. typhimurium* en el núcleo supraquiasmático ni en el núcleo del tracto solitario. Algunos estudios realizados en ratones reportan un aumento muy claro en la actividad del núcleo del tracto solitario así como de otras áreas cerebrales al inducir una infección gastrointestinal con *C. jejuni* (Gaykema et al. 2004; Goehler et al. 2005; Goehler et al. 2008). Cabe destacar que *C. jejuni* es un patógeno gastrointestinal que, a diferencia de *S. typhimurium*, no puede migrar fuera del intestino para causar una infección sistémica, por lo que es posible que en este caso, la detección por el sistema nervioso sea solamente a través de las aferentes vagales o espinales y no a través de la vía humoral. Otro estudio evaluó el papel de las aferentes vagales en la detección de la infección por *S. typhimurium* en ratones y observaron que, igual a lo que sucede con *C. jejuni*, el núcleo del tracto solitario se activa después de 24 horas de infección (Riley et al. 2013); además, este efecto es prevenido por la lesión química de las aferentes vagales. Estas investigaciones refuerzan la idea de que el sistema nervioso es capaz de detectar la infección y por ende tener alguna influencia en el desarrollo



de ésta, sin embargo, las condiciones utilizadas en este estudio no fueron capaces de replicar las observaciones realizadas en ratones. Los resultados obtenidos en este estudio pudieron estar influidos por el modelo de infección: es posible que, debido a la baja infectividad de la bacteria utilizada (lo que se discutirá más adelante), la magnitud de la infección sea tan baja que se pueda controlar a nivel local, sin necesidad de señalar esta información hacia el cerebro. Por lo tanto, es probable que la magnitud del reto inmune influya en su detección por el sistema nervioso; claramente, esta hipótesis deberá investigarse más a fondo. Múltiples estudios han confirmado el papel modulador del núcleo supraquiasmático ante un reto con LPS (Guerrero-Vargas et al. 2014; Marpegan et al. 2009; Kalsbeek et al. 2015; Kalsbeek et al. 2012), por lo que sería interesante estudiar en qué condiciones, el núcleo supraquiasmático y el hipotálamo en general, son capaces de detectar e influir en la respuesta inmune y en cuáles no.

C-fos como marcador de activación neuronal

c-fos forma parte de los llamados “genes de expresión temprana”, una serie de genes que las neuronas expresan desde los 20 minutos después de que éstas son activadas por algún estímulo (Herdegen & Leah 1998). *C-fos* se ha utilizado ampliamente como marcador de activación neuronal con muy buenos resultados. En el presente estudio se decidió utilizarlo como marcador de activación neuronal debido a su baja expresión basal, estabilidad y sencillez de la técnica inmunohistoquímica para detectarlo. Como se discutió con anterioridad, varios estudios previos han demostrado que *c-fos* funciona adecuadamente como marcador de activación neuronal cuando ésta es inducida por un estímulo de naturaleza inmune, por ello es poco probable que la elección de este marcador haya impedido observar la activación neuronal inducida por la infección. Sin embargo, es importante considerar la utilización de otros marcadores como *c-jun* o *EGR-1* que también podrían dar buenos resultados.



Posibles mecanismos involucrados en las diferencias circadianas en la infección.

Debido a que las diferencias circadianas en la respuesta a *S. typhimurium* no parecen estar dadas por la detección por las aferentes vagales (debido a que no hay diferencias en la activación neuronal del núcleo del tracto solitario), es probable que estas diferencias se encuentren reguladas a otro nivel. El hecho de que no se observe diferencia en la cantidad de bacteria de manera inicial (8 y 24 hrs) sino hasta después (60 y 72 hrs) (Figura 6), apunta hacia un mecanismo relacionado con la respuesta del hospedero ante la infección en lugar de un mecanismo que ya esté operando desde el momento en que se inocula al animal. Existen muchas variables que afectan el progreso de la infección y muchas de ellas pueden variar de manera circadiana. Por ejemplo, se ha observado que la diferenciación de los linfocitos Th17 se encuentra favorecida en el día (Yu et al. 2013). Estos linfocitos proinflamatorios contribuyen en la eliminación de *S. enterica* (Schulz et al. 2008), por lo que en el día podría estar favorecida la eliminación de la bacteria. De igual manera, la permeabilidad intestinal es mayor durante la noche (Kyoko et al. 2014), que fue la fase donde se observó mayor cantidad de *S. enterica* en el intestino. Por otro lado, la microbiota juega un papel fundamental en el desarrollo de la infección, ya que algunas moléculas producidas por ésta, como el H₂S, pueden favorecer la replicación de la bacteria, mientras que otras como el propionato pueden tener el efecto contrario (Thiennimitr et al. 2012; Ahmer & Gunn 2011). Varios estudios han reportado que la microbiota presenta un ritmo circadiano, tanto en sus componentes bacterianos como en los metabolitos producidos por éstos (Thaiss et al. 2014; Liang et al. 2015), lo que podría contribuir a las diferencias circadianas en la infección.

La alimentación también es un factor que influye en el progreso de la infección. Se ha reportado que el ayuno en ratas induce una mayor invasión de órganos por *S. enterica* (Havelaar et al. 2001). Las ratas comen la mayoría de su alimento durante el periodo de oscuridad y comen muy poco durante el periodo de luz. Por esto, al



inicio del periodo de luz (ZT2), se encuentran bien alimentadas mientras que al inicio del periodo de oscuridad (ZT14) apenas empiezan a comer. Debido a que no se ayunó a las ratas en el presente estudio, es posible que la cantidad de comida ingerida previa a la inoculación tuviera algún efecto en el desarrollo posterior de la infección.

El papel de TNF- α en la infección por *S. typhimurium*

Con el objetivo de elucidar algún mecanismo que favorezca las diferencias día-noche, se realizó la medición de TNF- α en el tejido intestinal de las ratas y se observó que las ratas inoculadas en ZT2 aumentan la producción de TNF- α al ser inoculadas con Salmonella, mientras que las ratas inoculadas en ZT14 no producen mayor cantidad de TNF ante la bacteria (después de 72 hrs). Varios estudios han demostrado que TNF- α es importante en la protección ante *S. enterica*, ya que si se bloquea la producción de esta citocina aumenta la cantidad de bacteria en los órganos (Nakano et al. 1990; Mastroeni et al. 1995). Esta protección podría estar dada mediante el reclutamiento de neutrófilos (los principales responsables de eliminar a la bacteria) al tejido afectado (Thiennimitr et al. 2012) Por lo tanto, la diferencia en los valores de TNF- α entre ZT2 y ZT14 podría ser un mecanismo responsable de la menor cantidad de bacteria en ZT2 después de 72 horas .

La diferencia en la respuesta de TNF- α ante la bacteria podría estar dada por los receptores tipo toll (TLRs) del sistema inmune innato. Se ha observado que existen ritmos circadianos en la expresión de TLR4, el receptor para LPS, tanto en el yeyuno (Froy & Chapnik 2007) como en el íleon de ratones (Mukherji et al. 2013), siendo mayor en el día que en la noche. Esta elevada expresión de TLR-4 en el día podría traducirse en una mayor detección de *S. typhimurium* por las células que culminaría en una mayor inducción de TNF- α y por lo tanto una mejor eliminación de la bacteria.



Modelo de infección

En general, el modelo de infección utilizado indujo poca recuperación de *S. typhimurium* en los tejidos, a pesar de que se inoculan 10^9 UFC, la máxima cantidad de bacteria que se recuperó fue alrededor de 10^4 UFC/g de tejido. Además, la cantidad de bacteria recuperada del intestino de muchos animales es nula, al igual que la recuperada del hígado y bazo (Figuras S5 y S6). Esto resulta un problema, ya que indica que la cepa utilizada posee una menor infectividad comparada con lo que se ha reportado en algunos otros estudios (Havelaar et al. 2001; Rodenburg, Keijer, et al. 2007; Islam et al. 2000). Es importante tomar en cuenta que la menor infectividad podría ocasionar dificultades para observar diferencias claras en el resto de las mediciones realizadas.

El hospedero juega un papel muy importante en el desarrollo de la infección, mientras que en ratones infectados con *S. typhimurium* se observa un cuadro clínico parecido a la fiebre tifoidea, en humanos este serovar ocasiona gastroenteritis (Santos et al. 2001). A pesar de que los pocos estudios realizados en ratas apuntan hacia una infección sistémica (Havelaar et al. 2001; Rodenburg, Keijer, et al. 2007; Islam et al. 2000), los resultados reportados sugieren que bajo estas condiciones, se podría estar induciendo gastroenteritis en lugar de una infección sistémica, esto debido a la poca invasión de órganos, la ausencia de TNF- α en sangre y la ausencia de signos evidentes de enfermedad como fiebre, falta de apetito, etc.

Bellet et al. (2013) realizaron un estudio similar en el cual inocularon a ratones con *S. typhimurium* en ZT4 y ZT16 y observaron diferencias en la cantidad de *S. typhimurium* recuperada del colon. Contrario a lo reportado en este estudio, Bellet et al. reportan una mayor recuperación de *S. typhimurium* en el día (ZT4) después de 72 horas de infección, mientras que no encontraron diferencias a las 60 horas. Las diferencias entre el estudio mencionado y este podría radicar tanto en la hora de estudio (ZT2 vs ZT4 y ZT14 vs ZT16) como en la especie del hospedero y la



cepa utilizada; como se mencionó anteriormente, todas estas variables tienen un papel importante en el progreso de la infección. Cabe mencionar que Bellet et al. reportan una mayor cantidad de TNF- α al inocular a los ratones en el día al igual que lo encontrado en este estudio.

9. Conclusiones

- La recuperación de *S. typhimurium* del tejido intestinal 8 y 24 horas después de la inoculación no es diferente entre las ratas inoculadas en el día o en la noche, mientras que 72 horas después de la inoculación es más alta al inocular a las ratas en ZT14 con respecto a ZT2.
- Las diferencias en la cantidad de *S. typhimurium* en el intestino depende de la hora de inoculación y no de la hora de sacrificio del animal, ya que si se sacrifica en un periodo contrario al periodo inoculado (60 horas), dicha diferencia se mantiene.
- Estas diferencias podrían estar mediadas por variaciones en la detección de *S. typhimurium* por sistema inmune innato, resultando en una mayor producción de TNF- α en el día, lo que favorece la eliminación de la bacteria.
- La cepa de *S. typhimurium* y/o las condiciones utilizadas no son óptimas para el estudio de la relación intestino-cerebro ya que resultan en una infectividad baja y mucha variabilidad entre sujetos.



10. Bibliografía

- Abrahamson, E.E. & Moore, R.Y., 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse : retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*, 916, pp.172–191.
- Ahmer, B.M.M. & Gunn, J.S., 2011. Interaction of Salmonella spp. with the Intestinal Microbiota. *Frontiers in microbiology*, 2(May), p.101. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3131049&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed November 26, 2014].
- Bechtold, D. a, Gibbs, J.E. & Loudon, A.S.I., 2010. Circadian dysfunction in disease. *Trends in pharmacological sciences*, 31(5), pp.191–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171747> [Accessed October 25, 2014].
- Behnsen, J. et al., 2015. Exploiting host immunity: the Salmonella paradigm. *Trends in Immunology*, 36(2), pp.112–120. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490614002282>.
- Bellet, M.M. et al., 2013. Circadian clock regulates the host response to Salmonella. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(24), pp.9897–902. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3683799&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed October 31, 2014].
- Bernik, T.R. et al., 2002. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *The Journal of experimental medicine*, 195(6), pp.781–788.
- Borovikova, L. V et al., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405(25).
- Broz, P. et al., 2012. Innate immune response to Salmonella Typhimurium, a model enteric pathogen. *Gut Microbes*, 3(2), pp.62–70.
- Buijs, R.M. et al., 2006. Organization of circadian functions: interaction with the body. *Progress in brain research*, 153(06), pp.341–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16876585> [Accessed November 28, 2014].
- Buijs, R.M., Escobar, C. & Swaab, D.F., 2013. The circadian system and the balance of the autonomic nervous system. In *Handbook of clinical neurology*.



Elsevier B.V., pp. 173–91. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24095125> [Accessed November 7, 2014].

Buijs, R.M. & Kalsbeek, A., 2001. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(July), pp.1–6.

Cailotto, C. et al., 2012. Neuroanatomical evidence demonstrating the existence of the vagal anti-inflammatory reflex in the intestine. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 24(2), pp.191–200, e93. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22118533> [Accessed October 24, 2014].

Cermakian, N. et al., 2013. Crosstalk between the circadian clock circuitry and the immune system. *Chronobiology international*, 30(7), pp.870–88. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23697902>.

Chrousos, G.P., 1995. The hypothalamic-pituitary adrenal axis and immune mediated inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 332(20), pp.1351–1362.

Clapham, J.C., 2012. Central control of thermogenesis. *Neuropharmacology*, 63(1), pp.111–123. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.10.014>.

Colwell, C.S., 2011. Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(10), pp.553–69. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21886186> [Accessed July 21, 2014].

Costes, L.M.M. et al., 2013. Neural networks in intestinal immunoregulation. , 9(3), pp.216–223.

Curtis, A.M. et al., 2014. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity*, 40(2), pp.178–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24560196> [Accessed October 27, 2014].

Dantzer, R., 2006. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Neurologic clinics*, 24(3), pp.441–60. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2909644&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed January 15, 2015].

Dantzer, R. et al., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(1), pp.46–56. Available at:



<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2919277&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed July 11, 2014].

Dantzer, R. et al., 2000. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain : parallel or convergent ? *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 85, pp.60–65.

Dibner, C., Schibler, U. & Albrecht, U., 2010. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual review of physiology*, 72, pp.517–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20148687> [Accessed July 14, 2014].

Escobar, C. et al., 2016. Food during the night is a factor leading to obesity. *Revista Mexicana de Trastornos Alimentarios*, pp.1–6. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2007152316000045>.

Froy, O. & Chapnik, N., 2007. Circadian oscillation of innate immunity components in mouse small intestine. *Molecular immunology*, 44(8), pp.1954–1960.

Furness, J.B., 2012. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 9(5), pp.286–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22392290> [Accessed November 5, 2014].

Gal-Mor, O., Boyle, E.C. & Grassl, G. a., 2014. Same species, different diseases: How and why typhoidal and non-typhoidal Salmonella enterica serovars differ. *Frontiers in Microbiology*, 5(August), pp.1–10.

Gaykema, R.P. a, Goehler, L.E. & Lyte, M., 2004. Brain response to cecal infection with *Campylobacter jejuni*: analysis with Fos immunohistochemistry. *Brain, behavior, and immunity*, 18(3), pp.238–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050651> [Accessed November 7, 2014].

Goehler, L.E. et al., 2005. Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: Early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. *Brain, Behavior, and Immunity*, 19, pp.334–344.

Goehler, L.E. et al., 2008. *Campylobacter jejuni* infection increases anxiety-like behavior in the holeboard: possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior. *Brain, behavior, and immunity*, 22(3), pp.354–66. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2259293&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed November 3, 2014].



- Golombek, D.A. & Rosenstein, R.E., 2010. Physiology of Circadian Entrainment. *Physiological reviews*, 90, pp.1063–1102.
- Guerrero-Vargas, N.N. et al., 2014. Reciprocal interaction between the suprachiasmatic nucleus and the immune system tunes down the inflammatory response to lipopolysaccharide. *Journal of neuroimmunology*, 273(1-2), pp.22–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24916044> [Accessed November 3, 2014].
- Guzman-Ruiz, M.A. et al., 2015. Role of the Suprachiasmatic and Arcuate Nuclei in Diurnal. *The Journal of Neuroscience*, 35(46), pp.15419–15429.
- Hastings, M.H., Brancaccio, M. & Maywood, E.S., 2014. Circadian pacemaking in cells and circuits of the suprachiasmatic nucleus. *Journal of neuroendocrinology*, 26(1), pp.2–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4065364&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed October 27, 2014].
- Havelaar, A.H. et al., 2001. A rat model for dose-response relationships of Salmonella Enteritidis infection. *Journal of Applied Microbiology*, 91, pp.442–452.
- Herdegen, T. & Leah, J.D., 1998. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain research. Brain research reviews*, 28(3), pp.370–490. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858769>.
- Iannaccone, P.M. & Jacob, H.J., 2009. Rats! *Disease Models & Mechanisms*, 2(5-6), pp.206–210. Available at: <http://dmm.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dmm.002733>.
- Islam, A.F.M.W. et al., 2000. Lipopolysaccharide-Induced Biliary Factors Enhance Invasion of Salmonella enteritidis in a Rat Model Lipopolysaccharide-Induced Biliary Factors Enhance Invasion of Salmonella enteritidis in a Rat Model. *Infection and Immunity*, 68(1).
- De Jong, H.K. et al., 2012. Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. *PLoS pathogens*, 8(10), p.e1002933. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3464234&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed July 13, 2014].
- Kalsbeek, a et al., 2006. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *Journal of biological rhythms*, 21(6), pp.458–469.



- Kalsbeek, a et al., 2015. The Suprachiasmatic Nucleus Generates the Diurnal Changes in Plasma Leptin Levels. , 142(6).
- Kalsbeek, A. et al., 2012. Differential Involvement of the Suprachiasmatic Nucleus in Lipopolysaccharide-Induced Plasma Glucose and Corticosterone Responses. *Chronobiology International*, 29(7), pp.835–849. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07420528.2012.699123>.
- Knutsson, A., 2003. Health disorders of shift workers. *Occupational Medicine*, 53(2), pp.103–108. Available at: <http://occmed.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/occmed/kqg048> [Accessed October 5, 2014].
- Kumar Jha, P., Challet, E. & Kalsbeek, A., 2015. Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, pp.1–14. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720715000350>.
- Kyoko, O. et al., 2014. Expressions of tight junction proteins Occludin and Claudin-1 are under the circadian control in the mouse large intestine: implications in intestinal permeability and susceptibility to colitis. *PLoS ONE*, 9(5), p.e98016. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4028230&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed November 7, 2014].
- Liang, X., Bushman, F.D. & FitzGerald, G. a., 2015. Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p.201501305. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1501305112>.
- Lim, C.H. et al., 2014. Independent Bottlenecks Characterize Colonization of Systemic Compartments and Gut Lymphoid Tissue by Salmonella. *PLoS Pathogens*, 10(7).
- Lundkvist, G.B., Hill, R.H. & Kristensson, K., 2002. Disruption of Circadian Rhythms in Synaptic Activity of the Suprachiasmatic Nuclei by African Trypanosomes and Cytokines. *Neurobiology of Disease*, 11(1), pp.20–27. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096999610290536X> [Accessed January 6, 2015].
- Lyte, M. et al., 2006. Induction of anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent of murine colonic hyperplasia *Citrobacter rodentium*. *Physiology & behavior*, 89(3), pp.350–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16887154> [Accessed November 1, 2014].



- Maier, L. et al., 2014. Granulocytes Impose a Tight Bottleneck upon the Gut Luminal Pathogen Population during Salmonella Typhimurium Colitis. *PLoS Pathogens*, 10(12), p.e1004557. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004557>.
- Marpegan, L. et al., 2009. Diurnal Variation in Endotoxin-Induced Mortality in Mice: Correlation With Proinflammatory Factors. *Chronobiology International*, 26(7), pp.1430–1442. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07420520903408358>.
- Mastroeni, P. & Grant, A.J., 2011. Spread of Salmonella enterica in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. *Expert reviews in molecular medicine*, 13(April), p.e12.
- Mastroeni, P., Skepper, J.N. & Hormaeche, C.E., 1995. Effect of anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on histopathology of primary Salmonella infections. *Infection and Immunity*, 63(9), pp.3674–3682.
- Moore, R.Y., 2013. The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. In *Progress in molecular biology and translational science*. Elsevier Inc., pp. 1–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23899592> [Accessed November 7, 2014].
- Moore, R.Y. & Eichler, V.B., 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, 42(1), pp.201–206.
- Moran-Ramos, S. et al., 2016. When to eat? The influence of circadian rhythms on metabolic health: are animal studies providing the evidence? *Nutrition Research Reviews*, pp.1–14. Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S095442241600010X.
- Mukherji, A. et al., 2013. Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs. *Cell*, 153(4), pp.812–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23663780> [Accessed September 3, 2014].
- Nakano, Y. et al., 1990. Protective effect of recombinant tumor necrosis factor-alpha in murine salmonellosis. *The Journal of Immunology*, 144(5), pp.1935–1941.
- Nakao, A., 2014. Temporal regulation of cytokines by the circadian clock. *Journal of immunology research*, 2014, p.614529. Available at:



<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3997878&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed November 7, 2014].

Nguyen, K.D. et al., 2013. Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6153), pp.1483–8. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/341/6153/1483.abstract>.

Nygård, M. et al., 2009. Rapid nitric oxide-dependent effects of tumor necrosis factor-alpha on suprachiasmatic nuclei neuronal activity. *Neuroreport*, 20(2), pp.213–217.

Oliva-Ramírez, J. et al., 2014. Crosstalk between circadian rhythmicity , mitochondrial dynamics and macrophage bactericidal activity. *Immunology*, 143(1), pp.490–497.

Paladino, N. et al., 2014. Modulation of mammalian circadian rhythms by tumor necrosis factor- α . *Chronobiology international*, 31(5), pp.668–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24527954> [Accessed December 30, 2014].

Riley, T.P. et al., 2013. Capsaicin-sensitive vagal afferent neurons contribute to the detection of pathogenic bacterial colonization in the gut. *Journal of neuroimmunology*, 257(1-2), pp.36–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4188534&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2014].

Rodenburg, W., Bovee-Oudenhoven, I.M.J., et al., 2007. Gene expression response of the rat small intestine following oral Salmonella infection. *Physiological genomics*, 30(2), pp.123–133.

Rodenburg, W., Keijer, J., et al., 2007. Salmonella induces prominent gene expression in the rat colon. *BMC microbiology*, 7, p.84.

Salgado-Delgado, R.C., Fuentes Pardo, B. & Escobar Briones, C., 2009. La desincronización interna como promotora de enfermedad y problemas de conducta. , 32(1), pp.69–76.

Santos, R.L. et al., 2001. Animal models of Salmonella infections: Enteritis versus typhoid fever. *Microbes and Infection*, 3, pp.1335–1344.

Scheer, F. a J.L. et al., 2005. Environmental light and suprachiasmatic nucleus interact in the regulation of body temperature. *Neuroscience*, 132(2), pp.465–477.



- Scheiermann, C. et al., 2012. Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity*, 37(2), pp.290–301. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3428436&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed October 27, 2014].
- Schulz, S.M. et al., 2008. IL-17A is produced by Th17, $\gamma\delta$ T cells and other CD4-lymphocytes during infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. *International Immunology*, 20(9), pp.1129–1138.
- Srinivasan, V., Mohamed, M. & Kato, H., 2012. Melatonin in Bacterial and Viral Infections with Focus on Sepsis : A Review. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic and Immune Drug Discovery*, 6, pp.30–39.
- Stephan, F.K. & Zucker, I., 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(6), pp.1583–1586.
- Thaiss, C. a et al., 2014. Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis. *Cell*, 159(3), pp.514–529. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.048>.
- Thiennimitr, P., Winter, S.E. & Bäumler, A.J., 2012. Salmonella, the host and its microbiota. *Current opinion in microbiology*, 15(1), pp.108–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3265626&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed November 15, 2014].
- Thygesen, P. et al., 2000. Histologic, cytologic, and bacteriologic examinations of experimentally induced *Salmonella typhimurium* infection in Lewis rats. *Comparative medicine*, 50(2), pp.124–132.
- Tracey, K.J., 2002. The inflammatory reflex. *Nature*, 420(December), pp.853–859.
- Voedisch, S. et al., 2009. Mesenteric lymph nodes confine dendritic cell-mediated dissemination of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and limit systemic disease in mice. *Infection and Immunity*, 77(8), pp.3170–3180.
- Wang, H. et al., 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421(6921), pp.384–388.
- Watson, K.G. & Holden, D.W., 2010. Dynamics of growth and dissemination of *Salmonella* in vivo. *Cellular Microbiology*, 12(10), pp.1389–1397.



Yu, X. et al., 2013. TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6159), pp.727–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24202171>.



11. Figuras suplementarias

Experimento	Número de ratas infectadas	Hora de inoculación	Tiempo de sacrificio	UFC/mL ($\times 10^9$) inoculados
6	2	ZT2	8 hrs	3.5
7	3	ZT2	8 hrs	9.0
8	4	ZT2	8 hrs	1.5
L	3	ZT2	8 hrs	3.1
	3		24 hrs	
	3		72 hrs	
24	2	ZT2	24 hrs	4.2
W1	2	ZT2	72 hrs	6.3
72	2	ZT2	72 hrs	3.1
	2	ZT14	72 hrs	2.6
60	3	ZT2	60 hrs	10.0
	3	ZT14	60 hrs	9.0
5	2	ZT14	8 hrs	3.0
N	4	ZT14	8 hrs	1.2
	5		24 hrs	
260	3	ZT14	60 hrs	3.0
272	3	ZT14	72 hrs	1.6
372	3	ZT14	72 hrs	3.0

Figura S1. Descripción de cada experimento. Se especifica la cantidad de ratas infectadas, la hora de inoculación y el tiempo de sacrificio en cada experimento, así como la cuenta viable de la suspensión de *S. typhimurium* administrada.



Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

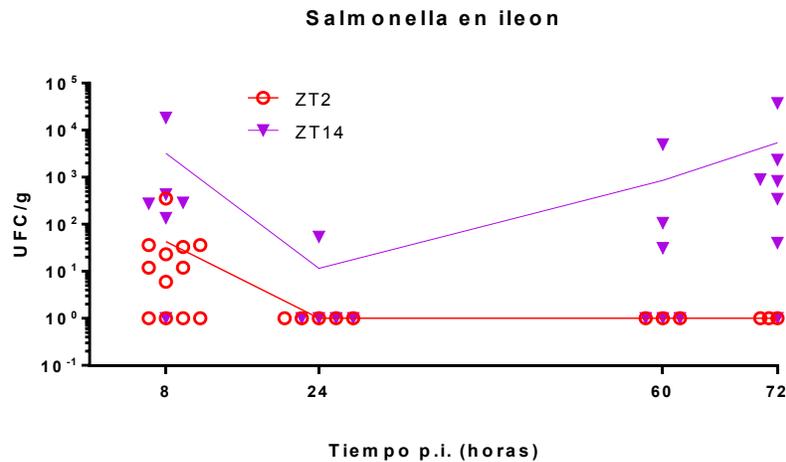


Figura S2. Cantidad de S. typhimurium en el íleon. Se muestra la cantidad de *S. typhimurium* en el íleon de las ratas inoculadas en el día (ZT2) y en la noche (ZT14) a lo largo del tiempo. ZT2: 8 hrs n=12, 24 hrs n=5, 60 hrs n=3, 72 hrs n=6; ZT14: 8 hrs n=6, 24 hrs n=5, 60 hrs n=6, 72 hrs n=8

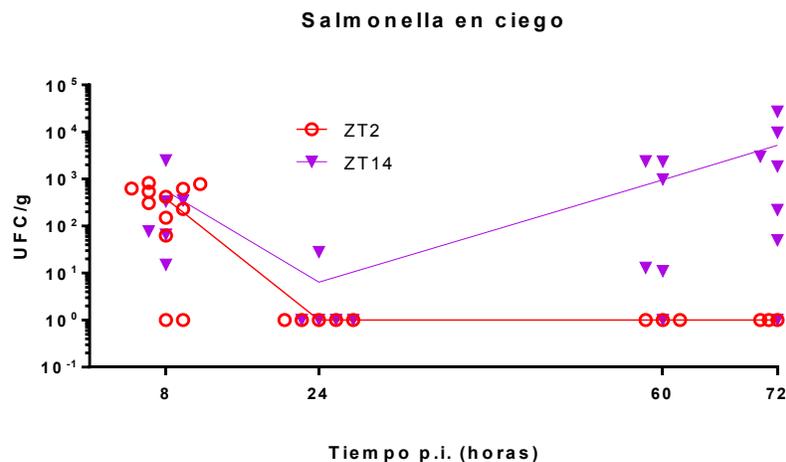


Figura S3. Cantidad de S. typhimurium en el ciego. Se muestra la cantidad de *S. typhimurium* en el ciego de las ratas inoculadas en el día (ZT2) y en la noche (ZT14) a lo largo del tiempo. ZT2: 8 hrs n=12, 24 hrs n=5, 60 hrs n=3, 72 hrs n=6; ZT14: 8 hrs n=6, 24 hrs n=5, 60 hrs n=6, 72 hrs n=8



Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

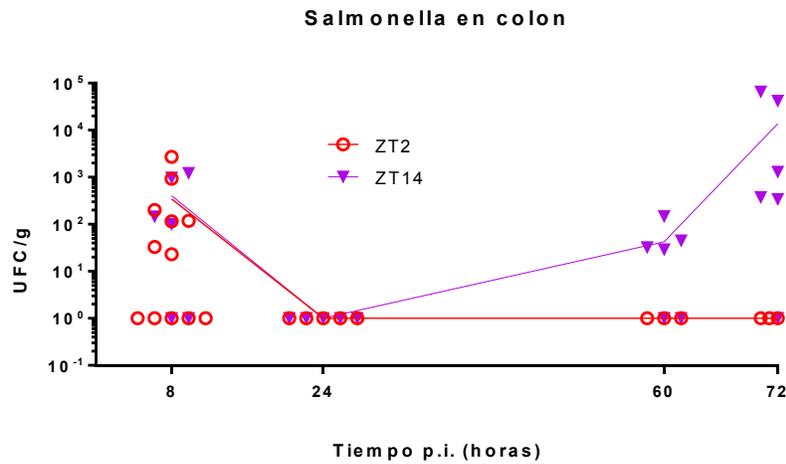


Figura S4. Cantidad de S. typhimurium en el colon. Se muestra la cantidad de *S. typhimurium* en el colon de las ratas inoculadas en el día (ZT2) y en la noche (ZT14) a lo largo del tiempo. ZT2: 8 hrs n=12, 24 hrs n=5, 60 hrs n=3, 72 hrs n=6; ZT14: 8 hrs n=6, 24 hrs n=5, 60 hrs n=6, 72 hrs n=8

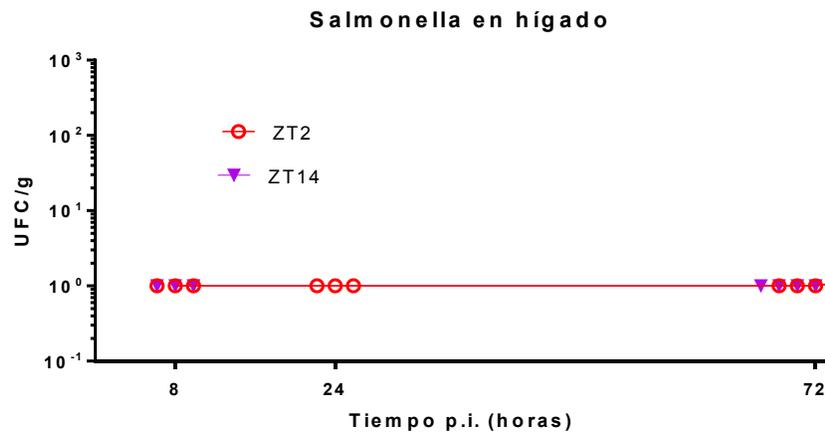


Figura S5. Cantidad de S. typhimurium en el hígado. Se muestra la cantidad de *S. typhimurium* en el hígado de las ratas inoculadas en el día (ZT2) y en la noche (ZT14) a lo largo del tiempo. ZT2: 8 hrs n=3, 24 hrs n=3, 72 hrs n=6; ZT14: 8 hrs n=3, 24 hrs n=0, 72 hrs n=8



Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

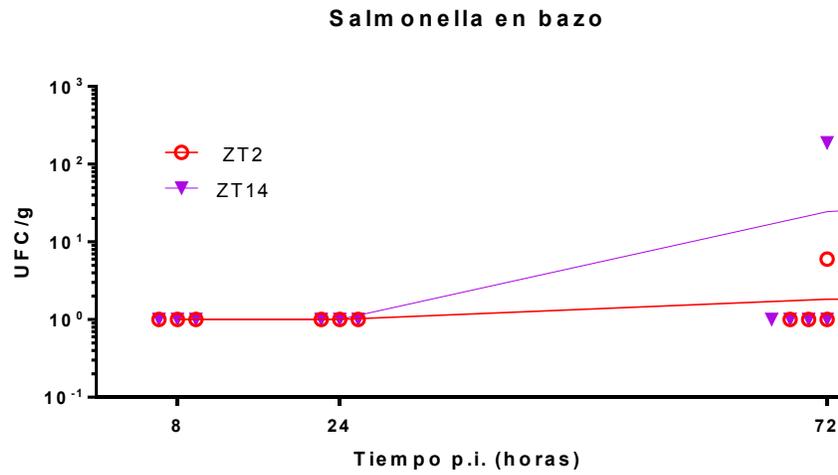


Figura S6. Cantidad de S. typhimurium en el bazo. Se muestra la cantidad de S. typhimurium en el bazo de las ratas inoculadas en el día (ZT2) y en la noche (ZT14) a lo largo del tiempo. ZT2: 8 hrs n=3, 24 hrs n=3, 72 hrs n=6; ZT14: 8 hrs n=3, 24 hrs n=3, 72 hrs n=8



Interacciones entre el intestino y el cerebro durante una infección por Salmonella

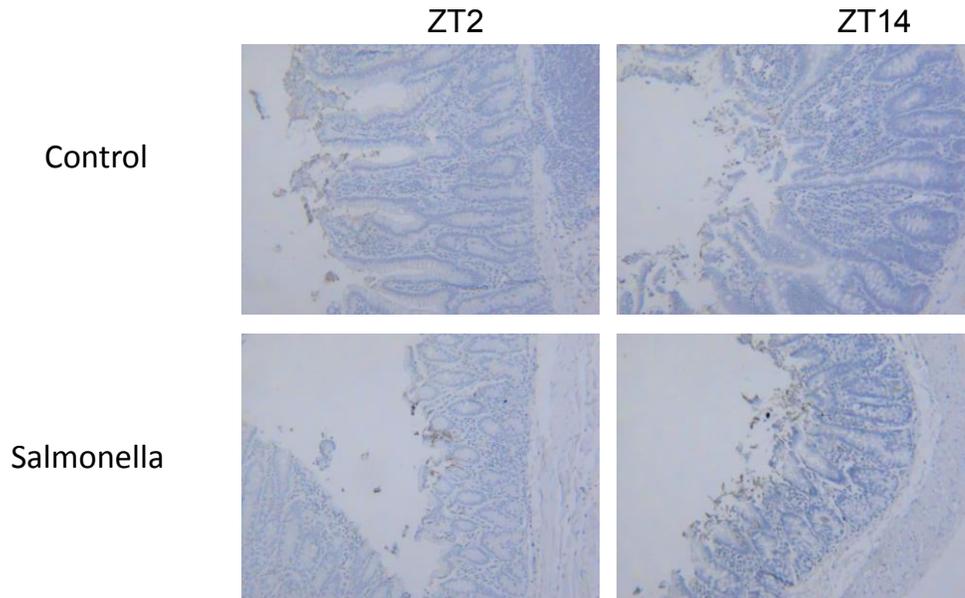


Figura S7. Fotografías representativas de la inmunohistoquímica para LPS de S. typhimurium. Se muestran cortes representativos de colon de las ratas administradas con S. typhimurium (Salmonella) o con vehículo (control) en el día (ZT2) o en la noche (ZT14), 72 hrs después de la administración. La marca color café corresponde a la inmunoreactividad para LPS de Salmonella sp.