



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Papel de la prostaglandina E2 como mensajero temprano del reflejo  
antiinflamatorio nervioso

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Esteban Santacruz Martínez

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Rudolf M. Buijs  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés  
[Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM](#)

Ciudad de México a. julio de 2018



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.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo recibido a través de la Beca Nacional otorgada a Esteban Santacruz Martínez con motivo de apoyo al estudio de posgrado a través del CVU/Número de becario 695673/599225.

También a CONACyT por el apoyo otorgado al Dr. Rudolf Buijs a través del proyecto con clave 220598 y a la UNAM por su apoyo PAPIIT con clave IG200314.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado de la UNAM por su apoyo económico para asistir al congreso *Neuroscience 2017* para presentar los resultados obtenidos en este trabajo y que se pueden encontrar en las memorias de dicho congreso con la clave 042.26.

A los miembros del comité tutor, especialmente a **Ruud Buijs** por la constante atención como tutor esforzándose en proporcionar muchas más preguntas que respuestas.

A la técnico de laboratorio, la Q.F.B. **María del Carmen Basualdo Sigales** por su apoyo técnico activo en la realización de los análisis que involucran PCR en este estudio, así como por su buena disposición atendiendo el suministro de los reactivos y anticuerpos utilizados en la realización de este trabajo.

## Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1 Sistema neuroinmunológico</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.1 Respuestas del sistema nervioso en respuesta a un estímulo</b> <b>inmunológico</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1.2 Vías de comunicación entre el sistema nervioso e inmunológico</b> ----	<b>8</b>
<b>1.2 Prostaglandinas</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2.1 Efecto de la prostaglandina E2 sobre el sistema inmunológico</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2.2 Efecto de la prostaglandina E2 sobre el sistema nervioso</b> .....	<b>13</b>
<b>2. Hipótesis</b> .....	<b>16</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>17</b>
<b>4. Método</b> .....	<b>18</b>
<b>5. Resultados</b> .....	<b>26</b>
<b>6. Discusión</b> .....	<b>33</b>
<b>7. Conclusiones</b> .....	<b>45</b>
<b>8. Perspectivas</b> .....	<b>46</b>
<b>9. Bibliografía</b> .....	<b>47</b>

## Resumen

Tras un estímulo inflamatorio el sistema inmunológico es regulado por señales provenientes del sistema nervioso autónomo. Para ello, el sistema nervioso autónomo debe recibir información del estado del sistema inmune. Se cree que la información de un reto inmunológico alcanza el sistema nervioso a través de citocinas que liberan las células del sistema inmune. Sin embargo, el sistema nervioso muestra señales de activación antes de que dichas citocinas puedan ser sintetizadas y secretadas. Por lo anterior, es probable que la activación temprana del sistema nervioso sea consecuencia de la detección directa de patrones moleculares asociados a patógenos o por la de algún mediador temprano no proteico. La primera posibilidad es debido a que se ha demostrado que fibras sensoriales del sistema nervioso autónomo pueden responder a lipopolisacárido (LPS) directamente *in vitro*. Por otro lado, se sabe que la prostaglandina E2 (PGE2) es un mediador lipídico sintetizado y secretado previo a la liberación de la citocina más temprana, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Para investigar el papel de la PGE2 en la detección de un reto inmune, se administró una dosis pirogénica de PGE2 *iv* a ratas Wistar macho y se observó activación neuronal, cuantificada por la presencia de c-Fos a los 50 minutos después del reto en la asta dorsal de la médula espinal y del núcleo del tracto solitario de manera similar. Al coadministrar LPS con indometacina, el cual es un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, al principio de la fase de descanso se previno la activación neuronal de la a la administración de LPS en los núcleos evaluados anteriormente, los cuales no son diferentes a los niveles basales o a los niveles de activación observados al administrar LPS al principio de la fase de actividad de los animales. Posteriormente, se evaluó si la falta de activación neuronal era consecuencia de una falta de secreción de PGE2, sin embargo, no se observaron diferencias entre los niveles plasmáticos de PGE2 en ambos puntos temporales, por tanto, probablemente la sensibilidad a PGE2 es distinto en cada uno de los puntos temporales. Para explorar la velocidad de reacción del sistema nervioso simpático al reto se administró LPS *i.v.* a ratas Wistar macho con o sin la coadministración de un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas llamado indometacina, y se detectó la velocidad a la que ocurren cambios cardiovasculares tras administrar LPS y se observó que hay un aumento en la frecuencia cardiaca 32.5 minutos después del reto con LPS. Por tanto, es poco probable que el LPS active directamente a fibras sensoriales. Se midieron los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$  y se observó que en los grupos donde no había activación neuronal había aproximadamente el triple de la concentración de TNF $\alpha$  en plasma. Por tanto, se determinó que los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$  son más dependientes de la activación neuronal y no tanto por los niveles de PGE2, la cual se sabe que tiene propiedades antiinflamatorias.

## **1. Introducción**

Las infecciones son un peligro agudo para la homeostasis de los organismos y necesitan ser neutralizadas por acciones bien coordinadas de los órganos del cuerpo. Para que esto suceda primero, es necesaria la detección e integración de información proveniente de todo el cuerpo seguido de una respuesta que active a las defensas del mismo para permitir el regreso del organismo a un estado de homeostasis. Tradicionalmente se considera que esta integración se lleva a cabo enteramente por el sistema inmune, sin embargo, recientemente se ha visto que el sistema nervioso es necesario para este proceso (Buijs et al., 2008).

Al igual que cualquier otro reto que pueda resultar peligroso para el estado de homeostasis, lo ideal es que el desafío sea detectado y contrarrestado a la mayor brevedad.

Un ejemplo de esto es un estado de hiper o hipoglicemia, el cual es contrarrestado induciendo la liberación de glucosa por el hígado así como produciendo la sensación de hambre si el nivel de glucosa en sangre es bajo; o induciendo la liberación de insulina del páncreas en caso contrario pues tanto un exceso como una carencia de glucosa resulta ser perjudicial para el organismo (Triplitt, 2012).

Por mucho tiempo no se consideró que el sistema nervioso estuviera involucrado en este fenómeno, sin embargo, hoy en día se sabe que si el cerebro detecta un exceso de glucosa en sangre puede inducir la secreción parasimpática de acetilcolina en el páncreas (Thorens, 2011).

De manera similar, el sistema inmunológico debe estar regulado de manera estricta. Por un lado, si no se controla la infección, la competencia del organismo con los microorganismos por recursos resulta en la muerte y por otro lado una respuesta inmunológica exacerbada

resulta en daño para el mismo organismo que también puede resultar en la muerte a consecuencia de una respuesta inmunológica exacerbada (Gerlach, 2016).

### **1.1 Sistema neuroinmunológico**

El sistema inmunológico y el nervioso han sido estudiados como campos independientes, que coincidían sólo para estudiar los casos de fenómenos patológicos dentro del sistema nervioso. Hoy en día se sabe que tienen una interacción estrecha en todos los órganos del cuerpo. Esto se ve facilitado porque muchas moléculas de comunicación que se consideraban estrictamente de uno de los dos sistemas pueden ser secretados y detectados por ambos (“Neuroimmune communication,” 2017).

A diferencia de otros sistemas en el cuerpo, el sistema inmunológico se consideró relativamente independiente debido a que posee mecanismos de retroalimentación negativa que permiten que se regule a sí mismo (Mueller, 2003). A eso se suma la facilidad de estudiar las células que componen al sistema inmune *in vitro* mediante el cultivo de las células que lo componen, sin considerar la influencia que podrían tener otros sistemas en los procesos que lo involucran a pesar del descubrimiento de la inervación de órganos del sistema inmunológico como son la médula ósea (Kuntz & Richins, 1945) y el timo (Roggero et al., 2011), que son considerados órganos inmunológicos primarios; así como órganos inmunes secundarios como son el bazo (Livett et al., 1968) y nódulos linfáticos (Giron et al., 1980).

La intrincada comunicación que el sistema inmunológico y nervioso mantienen entre sí podría ser suficiente como para considerarlos como un holosistema, más que sencillamente

dos elementos discretos que se comunican. Siendo éste el caso, dentro de sí deben existir sistemas de retroalimentación que podrían formar un reflejo.

### **1.1.1 Respuestas del sistema nervioso en respuesta a un estímulo inmunológico**

Se sabe que el sistema nervioso responde a desafíos inmunológicos debido a que en fenómenos inflamatorios se pueden observar respuestas que sólo pueden ser atribuidos al sistema nervioso. Ejemplos de esto son cambios conductuales como retracción social y disminución en la ingesta de alimento. Al respecto, se ha propuesto que la depresión idiopática puede ser causada por una comunicación incorrecta entre sistema inmunológico y sistema nervioso (Dantzer, 2001). Otro ejemplo es la respuesta febril, pues se sabe que un aumento en la temperatura es consecuencia de un aumento en la actividad de neuronas simpáticas motoras que proyectan a órganos termogénicos como el tejido adiposo pardo (Roth & Blatteis, 2014).

De manera directa, se ha demostrado que al administrar lipopolisacárido (LPS) se induce un aumento en la tasa de disparo neuronal hacia el bazo (MacNeil et al., 1996) así como por la presencia del factor de transcripción c-Fos en el núcleo de neuronas de diferentes áreas del cerebro como son el núcleo arqueado, la amígdala, el núcleo paraventricular del hipotálamo, en núcleo preóptico, entre muchos otros (Dallaporta et al., 2007).

Aunque es claro que hay activación del sistema nervioso tras un desafío inmunológico, aún no se ha esclarecido qué factor es el primer responsable de dicha activación y existen muchos posibles candidatos responsables de esto (Fig. 1).

Un posible responsable de la activación del sistema nervioso es el LPS mismo, pues se sabe que los receptores tipo Toll (TLR) (que son receptores innatos de patrones moleculares

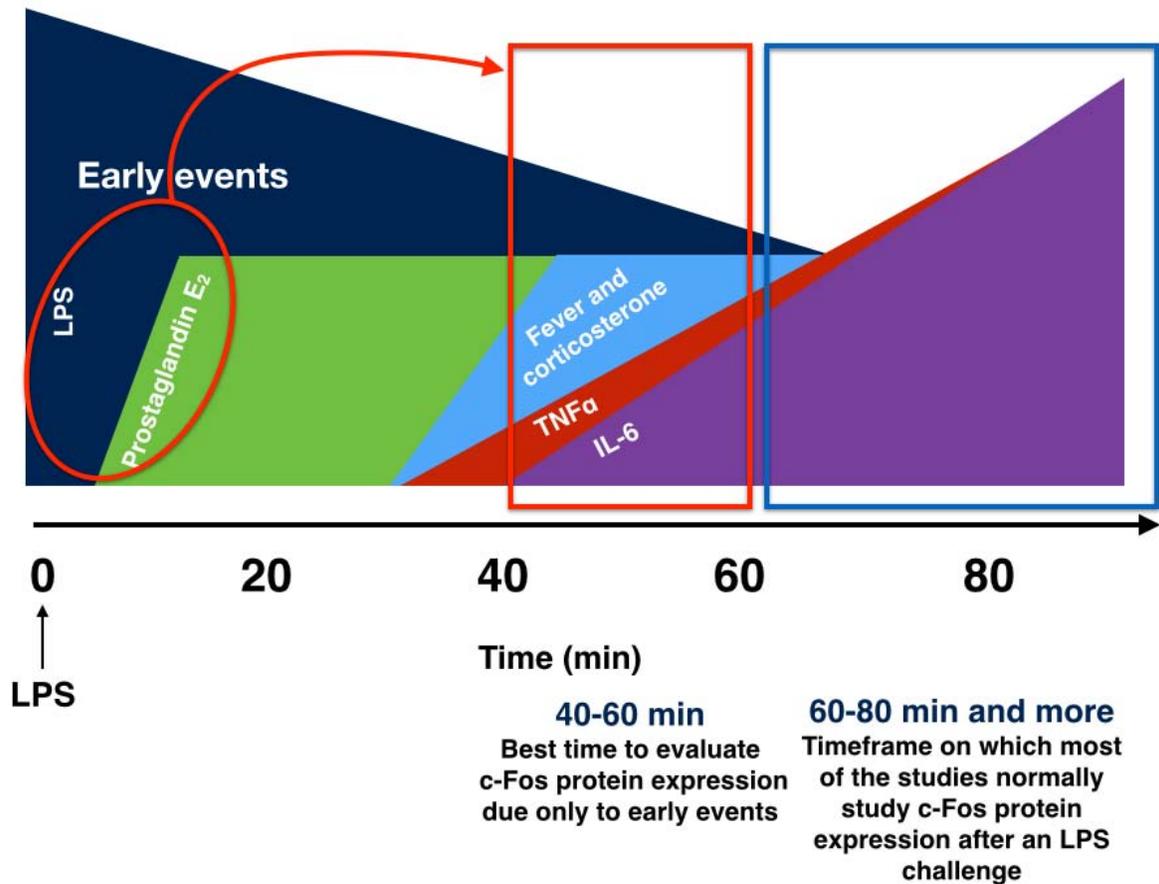


Figura 1. Eventos tempranos como consecuencia de la administración de un desafío inmunológico con LPS. Se puede observar que temporalmente la prostaglandina E<sub>2</sub> puede ser el primer elemento (Soto-Tinoco et al., 2016).

asociados a patógenos y que se encuentran en las membranas de todas las células del sistema inmune innato) , específicamente de TLR4 en el caso de la detección de LPS, pueden expresarse en neuronas del ganglio de la raíz dorsal, las cuales comunican a neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Barajon et al., 2009).

Sin embargo resulta poco probable que la activación de los TLR conlleve a la generación de un potencial de acción debido a que la vía de transducción de TLR4 induce la activación de transcripción de otros genes, como citocinas, pero no vías de transducción que puedan resultar en la generación de potenciales de acción (Lu et al., 2008).

Otro receptor capaz de detectar LPS que se encuentra en fibras sensoriales de neuronas del sistema nervioso autónomo es el canal de calcio TRPA1 y se ha demostrado en estudios *in vitro* que este receptor es capaz de inducir un aumento intracelular de calcio en neuronas del ganglio nodoso segundos tras administrar LPS al medio de cultivo de manera independiente de TLR4 (Meseguer et al., 2014).

A pesar de que *in vitro* se pueden ver respuestas neuronales en menos de 5 segundos, la administración de LPS *in vivo* induce un aumento en la tasa de despolarización de nervios simpáticos que comunican hacia el bazo hasta los 20 minutos después de su administración. También se observó que dosis bajas de LPS son suficiente para inducir esta actividad neuronal (MacNeil et al., 1996). Esto sugiere que el LPS *per se* no es capaz de activar a neuronas, o por lo menos no de manera rápida.

Debido al tiempo en que se observa una reacción neuronal es poco probable que dicha activación sea atribuida a la secreción de TNF $\alpha$  debido a que a los 20 minutos recién comienza a ser detectable en plasma (Soto-Tinoco et al., en preparación).

La posibilidad de que el TNF $\alpha$  sea la primera molécula que comunica al sistema inmunológico con el sistema nervioso también queda descartado debido a las diferencias circadianas en la cantidad de TNF $\alpha$  en la circulación tras un reto con LPS. Esto debido a que se ha observado que 80 minutos después de la administración de LPS la concentración de TNF $\alpha$  en plasma es mayor al principio de la fase de descanso con respecto al inicio de la fase de actividad de los individuos (Guerrero-Vargas et al., 2014), mientras que la administración i.v. de LPS induce un mayor número de neuronas activas en áreas sensoriales del sistema nervioso autónomo como son el asta dorsal de la médula espinal y el núcleo del tracto solitario del tallo cerebral cuando es administrado al principio de la fase

de actividad con respecto al inicio de la fase de descanso. Es decir, cuando los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$  son más bajos (Soto-Tinoco et al., en preparación).

Por todo lo anterior, es posible que la activación neuronal sea consecuencia de la secreción de algún otro producto temprano de células inmunes, como podrían ser especies reactivas de oxígeno o la síntesis de productos lipídicos como sería la prostaglandina E2 (PGE2).

La PGE2 resulta un candidato ideal para la señalización entre sistema inmunológico y el sistema nervioso debido a que su síntesis puede ocurrir de manera más rápida que la síntesis de TNF $\alpha$  debido a que su síntesis ocurre por el procesamiento enzimático de lípidos de la membrana celular (Li et al., 2005).

También se ha visto involucrado en fenómenos relacionados al dolor neuropático, donde se podría considerar que no hay estimulación del sistema inmunológico o que por lo menos donde no hay influencia de componentes bacterianos (Ma et al., 2010). Lo anterior debido a que se sabe que muchas neuronas sensoriales tienen receptores para PGE2 que son de la familia de receptores acoplados a proteína G.

Además, la administración de inhibidores de la síntesis de PGE2 suele ser recomendada para aminorar los malestares que son consecuencia de diferentes tipos de inflamación (Ahern et al., 1995). Es decir, tienen la capacidad de disminuir la señal que recibe el sistema nervioso de sitios inflamados.

### **1.1.2 Vías de comunicación entre el sistema nervioso e inmunológico**

Las posibilidades de comunicación entre cualquier sistema del cuerpo y el cerebro es a través del sistema nervioso autónomo por dos vías neuronales, que son la vía simpática y la parasimpática; y a la vía humoral (Fig. 2) (Soto-Tinoco et al., 2016).

Las tres vías de comunicación están integradas por núcleos y ganglios diferentes. La vía simpática recibe información periférica a través de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) que posteriormente proyecta a la asta dorsal (DH) de la médula espinal, posteriormente responde al comunicarse con neuronas de la columna intermedio lateral (IML) que a su vez proyecta a ganglios simpáticos y finalmente a los órganos blanco.

La vía parasimpática recibe información periférica a través del ganglio nodoso (NG) que proyecta principalmente a el núcleo del tracto solitario (NTS), la respuesta comienza cuando las neuronas del NTS se comunican con las del núcleo dorsomotor del vago (DMV) y estos proyectan directamente a los órganos blanco.

Finalmente, la vía humoral puede ser a través de la irrigación de compuestos solubles secretados por los diferentes órganos a torrente sanguíneo y que eventualmente entran en contacto con el cerebro, específicamente a través de los órganos circunventriculares.

Aunque estudios iniciales indicaron que la comunicación por la vía neuronal parasimpática vagal era la principal vía tanto sensorial como motora para la comunicación del sistema nervioso con el sistema inmunológico (Rosas-Ballina et al., 2008) (Borovikova et al., 2000), esto ha sido descartado pues se ha observado que interrumpir comunicación parasimpática no altera la inducción de fiebre como consecuencia de la administración de LPS (Ootsuka et al., 2008).

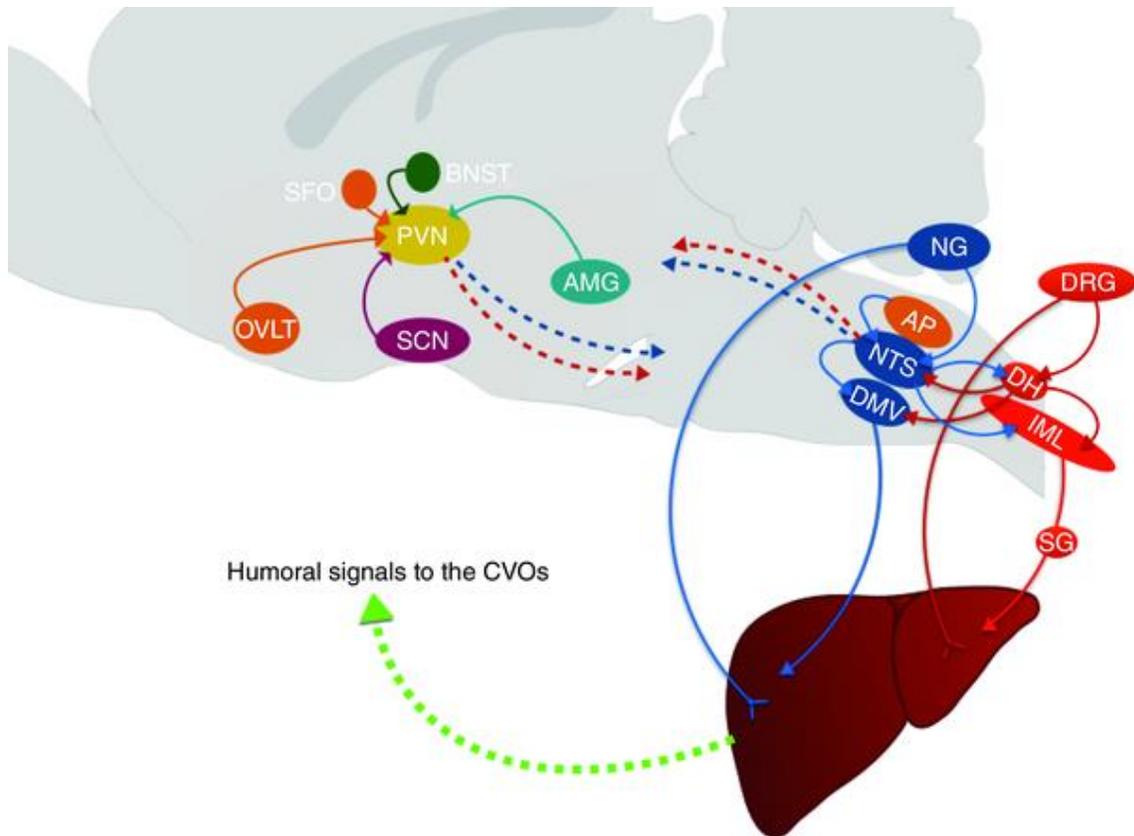


Figura 2. Esquema de las vías a través de las cuales el sistema nervioso central recibe información del cuerpo. Se puede apreciar una vía humoral, en la cual los mediadores solubles llegan al sistema nervioso central a través de la sangre por los órganos circumventriculares como son el área postrema (AP), y dos neuronales, la simpática y la parasimpática. La simpática comienza con fibras sensoriales de neuronas cuyos somas se encuentran en el ganglio de la raíz dorsal (DRG) y que proyectan a la asta dorsal de la médula espinal (DH); éstas a su vez conectan con neuronas motoras de la columna intermedio lateral de la médula espinal (IML) que proyectan a ganglios simpáticos y finalmente al órgano blanco. La rama parasimpática comienza con fibras sensoriales de neuronas cuyos somas se encuentran en el ganglio nodoso que proyectan al núcleo del tracto solitario (NTS), esto proyecta al núcleo dorsomotor del vago (DMV) que proyecta al órgano blanco (Soto-Tinoco et al., 2016).

Recientemente, se llegó a la conclusión de que al estimular eléctricamente el nervio vago había supresión inmune debido a que de manera concomitante a la activación parasimpática había activación de neuronas del sistema nervioso simpático en el tallo cerebral (Abe et al., 2017).

Además de ser descartada la supresión por actividad motora del vago, otros experimentos indican que el sistema nervioso simpático tiene mayor importancia fisiológica disminuyendo la liberación de citocinas ante un estímulo de LPS intravenoso, pues al cortar el nervio esplácnico hay una respuesta de TNF $\alpha$  en plasma tres veces mayor que en los controles respectivos (Martelli et al., 2014).

En nuestro grupo de trabajo se llegó al mismo resultado y conclusiones, además de que se observó que la denervación simpática también disminuye la cantidad de neuronas activadas en el asta dorsal de la médula espinal evaluado como número de neuronas que expresan el marcador c-Fos en su núcleo (Cázarez-Márquez, 2014).

## **1.2 Prostaglandinas**

Las prostaglandinas son moléculas de naturaleza lipídica que son el producto del procesamiento enzimático del ácido araquidónico por enzimas llamadas ciclooxigenasas. A partir de esta primera reacción se obtiene prostaglandina G<sub>2</sub> la cual a su vez es sustrato de otras enzimas que producen otras prostaglandinas o tromboxanos (Fig.3) (Simmons et al., 2004).

Dentro de la familia de estas moléculas cada prostaglandina ejerce funciones diferentes a través de receptores específicos en una gran variedad de linajes celulares. Ejemplos de esto son las prostaglandinas I y los tromboxanos que regulan respectivamente a la baja y al alza la agregación plaquetaria así como la vasodilatación y vasoconstricción (Smith et al., 1980), o la continuación del ciclo estral en hembras al ser secretado prostaglandina F<sub>2</sub> por el endometrio en caso de no haber implantación (Norjavaara & Rosberg, 1986).

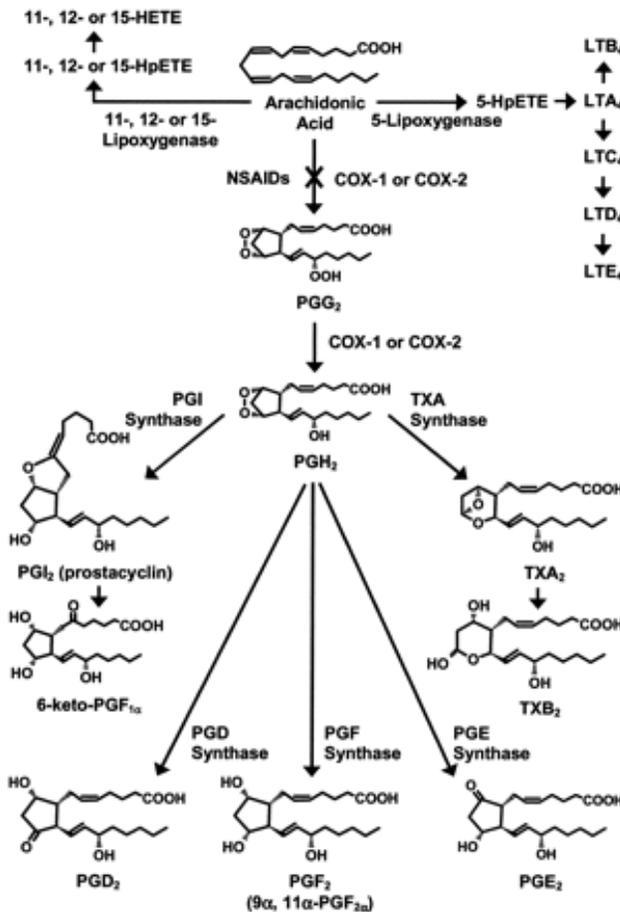


Figura 3. Diagrama de derivados del ácido araquidónico donde se observa a las enzimas que catalizan la reacción de los diferentes intermediarios. Se puede observar en la esquina inferior izquierda la PGE2.

Otro ejemplo es la PGE2, la cual se sintetiza en respuesta a desafíos inmunológicos, a la administración de citocinas o inclusive en respuesta a estrés psicológico. Dichos efectos son debidos a que tanto las células del sistema nervioso como del sistema inmunológico contienen tanto la maquinaria enzimática para sintetizar, así como los receptores específicos para estas moléculas (Furuyashiki & Narumiya, 2011).

Como se mencionó previamente, un aspecto por el cual las PGEs son relevantes en eventos patológicos es porque la inhibición farmacológica de su síntesis es capaz de revertir muchos de

los efectos que tiene inyectar productos bacterianos a torrente sanguíneo como son la conducta depresiva asociada a la enfermedad (de Paiva et al., 2010), la reducción en la ingesta de alimento (Langhans, Harlacher, & Scharrer, 1989) y fiebre (Li et al., 2005).

Adicionalmente, se ha validado que estos efectos (la anorexia, la retracción social y la fiebre) son consecuencia de la falta de prostaglandinas y no sólo efectos secundarios de los fármacos que inhiben su síntesis, debido a que en los animales en los que se elimina una enzima fundamental para la síntesis de PGE2, la sintasa microsomal de prostaglandina E2,

estos efectos dejan de observarse. Esto es importante pues esta eliminación genética elimina específicamente la síntesis de PGE2 mientras mantiene intacta la síntesis de otras prostaglandinas, a diferencia de lo que podrían hacer los fármacos inhibidores de la ciclooxigenasa 1 y 2, que inhiben la síntesis de todos los miembros de la familia de las prostaglandinas (Pecchi et al.,2009).

A pesar de lo anterior, sigue sin conocerse si estos efectos son consecuencia de que la PGE2 deja de ser sensedada por el sistema inmunológico o el nervioso debido a que ambos poseen los receptores específicos para esta molécula.

### **1.2.1 Efecto de la prostaglandina E2 sobre el sistema inmunológico**

Aunque se sabe que prácticamente todas las células del sistema inmunológico son capaces de reconocer prostaglandinas, su papel en procesos inflamatorios es paradójico pues tiene roles tanto proinflamatorios (por su capacidad de actuar como quimioatrayente para macrófagos y factor que induce la degranulación de mastocitos) (Nakayama et al., 2006) como antiinflamatorios (al inducir la secreción de IL-10) (Stolina et al., 2000) e inducir una polarización hacia un perfil de linfocitos T cooperadores tipo 2 (Betz & Fox, 1991).

Los efectos que tiene la PGE2 sobre la respuesta inmunológica innata inicialmente parecen contradictorios, especialmente los resultados en los que se investiga el efecto de esta molécula sobre macrófagos (los cuales son los principales productores de TNF $\alpha$  en una fase aguda de activación inmunológica).

Por un lado, *in vivo*, la administración del inhibidor de la síntesis de prostaglandinas junto con LPS está reportado que amplifica la producción de TNF $\alpha$  (Teeling et al., 2010) (Sacco et al., 1998), cosa que no sucede *in vitro*, la indometacina no tiene efecto sobre la síntesis

de TNF $\alpha$  o interleucina 6 ante el estímulo con LPS; esto a pesar de que el tratamiento abatió en su totalidad la síntesis de PGE2 (Ogle et al., 1994).

Adicionalmente, la administración de PGE2 al medio de cultivo de macrófagos estimulados con LPS puede aumentar o disminuir la cantidad de TNF $\alpha$  que secretan a su medio de cultivo dependiendo de la dosis administrada, pues dosis de 0.1-10 ng/ml aumentan la liberación de TNF $\alpha$ , mientras que dosis mayores a 10 ng/ml lo disminuyen, todo lo anterior *in vitro* (Renz et al., 1988).

En contraste con lo anterior, los niveles plasmáticos de PGE2 alcanzan concentraciones máximas de 0.1 ng/ml a los 40 minutos tras una inyección de LPS de 10  $\mu$ g/kg (Steiner et al., 2006), y en experimentos con dosis mayores y a tiempos mayores se ha visto que 4 horas tras una inyección de LPS de 50  $\mu$ g/kg los niveles alcanzan 1.2 ng/ml (Kozaket al., 2006).

En conjunto, lo anterior indica que los efectos de la PGE2 sobre el sistema inmunológico probablemente involucran otro sistema. Por tanto, valdría la pena explorar la posibilidad de que el sistema nervioso también esté involucrado y pueda explicar las diferencias que se observan entre modelos *in vitro* e *in vivo*, pues se sabe que tiene tanto la capacidad de regular la liberación de citocinas como de detectar prostaglandinas.

### **1.2.2 Efecto de la prostaglandina E2 sobre el sistema nervioso**

Además de producirse a nivel periférico, se sabe que en el cerebro tanto las neuronas como las células gliales (sin contar a las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos) son capaces de sintetizar PGE2 (Vidensky et al., 2003).

En cerebro se ha observado que 5 horas después de la administración de una dosis de 120 µg/kg de LPS la cantidad de PGE2 en líquido cefalorraquídeo es aproximadamente 10 mayor que en plasma. Esta acumulación ocurre debido a que su eliminación depende del proceso pasivo de sustitución de líquido cefalorraquídeo (Eskilsson et al., 2017).

También se sabe que estresores psicológicos, como la restricción de movimiento, tienen la capacidad de aumentar los niveles de prostaglandinas en cerebro a través de un incremento en la cantidad de *Cox-2* expresada en distintos núcleos cerebrales (García-Bueno et al., 2008).

Además de observarse aumento en la cantidad de la COX 1 y 2, se ha visto que la modificación en la expresión de los receptores está involucrada en efectos similares a conductas de enfermedad como puede ser la conducta impulsiva, en la cual está mediada por una exacerbación en la descarga de neuronas dopaminérgicas en la corteza (Matsuoka et al., 2005).

Otro efecto similar es observado en la *sustancia nigra* la cual disminuye su actividad dopaminérgica ante la estimulación por PGE2 de neuronas del putamen caudado, probablemente a través de un aumento en el tono GABAérgico, causando un efecto depresor sobre el sistema nervioso (Tanaka et al., 2009).

A pesar de que el paradigma gira alrededor de que la importancia de la PGE2 es debida a que ésta es producida por vasos sanguíneos cercanos al cerebro, se ha demostrado que en caso de respuestas tempranas la prostaglandina sintetizada por la periferia es más importante para producir una reacción febril temprana (menos de 30 minutos) pues administrar un anticuerpo neutralizante para PGE2 sólo tiene efecto cuando es administrado

i.v. y no cuando es administrada directamente en líquido cefalorraquídeo (Steiner et al., 2006).

## **2. Hipótesis**

La síntesis de prostaglandina E2 activa a las neuronas del sistema nervioso autónomo simpático y esta activación desencadena en una respuesta inhibitoria sobre la producción de citocinas por el sistema inmunológico.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Determinar si los efectos inmunorreguladores de la PGE2 están mediados por el sistema nervioso simpático.

#### **3.2 Objetivos particulares**

- Evaluar la activación neuronal por inmunohistoquímica para c-Fos en el DH y el NTS ante un estímulo con PGE2, o LPS en combinación con indometacina, en distintos momentos del ciclo circadiano.
- Cuantificar la concentración plasmática de TNF $\alpha$  y PGE2 ante un estímulo con LPS en distintos momentos del ciclo circadiano y cómo lo afecta la administración de indometacina.
- Cuantificar la cantidad de mRNA de TNF $\alpha$  en hígado ante un estímulo con LPS en distintos momentos del ciclo circadiano y cómo lo afecta la administración de indometacina.
- Determinar el tiempo al cual hay cambios cardiovasculares ante un estímulo con LPS en distintos momentos del ciclo circadiano y cómo lo afecta la administración de indometacina a través de evaluaciones telemétricas.

#### **4. Método**

##### *Animales experimentales*

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de aproximadamente 8 semanas de edad y de 250-350 g de peso. Los animales fueron mantenidos con agua y alimento convencional (Teklad Global de la marca Envigo) *ad libitum* y con un fotoperiodo de 12:12 con encendido a las 7:00 horas y apagado a las 19:00 horas; por este motivo las 7:00 horas será referido como ZT0 y por tanto ZT2 y ZT14 corresponden a las 9:00 horas y a las 21 horas, respectivamente. Para los experimentos realizados en la fase de oscuridad se utilizó un foco rojo de baja intensidad para iluminar el cuarto, el cual se ha demostrado que no altera el ritmo circadiano de las ratas (Bedrosian et al., 2013). Los animales fueron provistos por el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

##### *Procedimientos quirúrgicos*

Se realizó el procedimiento de canulación para poder administrar líquidos por vía intravenosa sin la necesidad de manipular a los animales; lo anterior debido a que un estímulo táctil puede desencadenar la activación neural de la médula espinal y opacar la señal de activación por c-Fos observable por el estímulo del LPS. Para la canulación intravenosa se anestesió a los animales utilizando una mezcla de Ketamina (200 mg/kg) y Xilacina (20 mg/kg) por vía intraperitoneal. Se implantó una cánula de polietileno en la vena yugular externa derecha. La cánula se exteriorizó de manera subcutánea a través de la espalda, a la altura de las escápulas y se fijó con un arnés al animal. Tras la cirugía la cánula se llenó con una mezcla de glicerol, antibiótico (penicilina y estreptomicina) y heparina para evitar la coagulación y la infección. A estos animales se les permitió un

periodo de recuperación de 7 días después de la cirugía tras lo cual se realizó el experimento. Este tiempo de recuperación es suficiente para que los niveles séricos de TNF $\alpha$  sean indetectables (Guerrero-Vargas et al., 2014).

Sólo los animales a los que se les midieran parámetros cardiovasculares, se les implantó además un aparato telemétrico en la cavidad abdominal el cual cuenta con un sensor de presión que se introdujo en la aorta abdominal, caudal a la arteria renal y rostral a la bifurcación de las arterias ilíacas. El aparato es posteriormente fijado a la capa muscular de la cavidad peritoneal con hilo de sutura.

#### *Administración de sustancias y toma de muestras*

Para los experimentos que involucraron el uso de indometacina, ésta se administró 30 minutos previo al desafío con LPS a través de la cánula intravenosa implantada. Para ello se disuelve la indometacina (Sigma I7378) en una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM en una concentración de 3.3 mg/ml. Tras su disolución se diluye en PBS o salina en una proporción 1:9; la dosis que se administra por rata es de 10 mg/kg de peso corporal en un volumen de 3 ml/kg.

Previo a la administración de LPS se toma otra muestra de sangre (a la cual se llamó tiempo 0). Se administra una dosis de LPS de *Escherichia coli* (Sigma L3129) de 2  $\mu$ g/kg de peso corporal del animal por vía intravenosa. Tras esto se tomó muestra de sangre a los 0, 10, 20 y 50 minutos. Aquellas ratas que recibieron PGE<sub>2</sub> (Cayman Chemical 363-24-6), ésta fue administrada en una concentración de 100  $\mu$ g/kg diluida en EtOH al 1% en solución salina. Las muestras fueron almacenadas en tubos tratados con EDTA como anticoagulante e indometacina en DMSO para dar una concentración final de indometacina de 2  $\mu$ g/ml en la

sangre y colocadas inmediatamente en hielo. Una vez obtenidas todas las muestras éstas fueron centrifugadas a 4°C a una velocidad de 4000 rpm durante 8 minutos. Se aisló el suero y se almacenó a – 80°C hasta su uso.

### *Eutanasia y perfusión*

La eutanasia se realizó 50 minutos después de la administración del LPS y se realiza por una sobredosis de pentobarbital sódico por vía intravenosa (60 mg/kg), la cual cumple con la NOM-062-ZOO-1999 al cumplir con el punto 9.2.2.2 por hacer perder la conciencia a los animales en menos de 2 segundos. Después de la administración de esta dosis letal de anestesia (y antes de que el corazón cese de latir) se perfundió a los animales con al menos 200 ml solución salina isotónica (NaCl 0.9%), o más si el hígado aún no perdía toda la sangre, y posteriormente con 150 ml de paraformaldehído al 4% en PBS. Se disecó el cerebro, tallo cerebral y la sección torácica 4-10 de la médula espinal las cuales permanecieron 24 horas más en paraformaldehído y por dos noches en sacarosa (30 %) para su crioprotección. Se realizaron cortes coronales de 40 µm para el análisis por inmunohistoquímica.

### *Inmunohistoquímica de c-Fos*

Se seleccionaron cortes de la médula espinal y de la sección del tallo cerebral donde se puede encontrar el área postrema. Estas secciones se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario policlonal de conejo dirigido contra c-Fos (Factor de dilución de 1:2000) diluido en PBS adicionado con 0.5% de Tritón X-100 para permeabilizar las células y 0.25% de albúmina sérica bovina. Los cortes se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora y luego a 4°C durante toda la noche en agitación constante. Los cortes se lavaron

con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario de burro anti-conejo conjugado con biotina diluido 1:500 durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes fueron incubados con el complejo avidina-biotina (Factor de dilución 1:500) durante una hora. El revelado de la reacción se realizó incubando los cortes con una solución de Diaminobenzidina (DAB) al 0.025%, 0.0005% de  $\text{NiNH}_4\text{SO}_4$ , y 0.01% de peróxido de hidrógeno en TBS durante 15-50 min. Los cortes se montaron sobre portaobjetos gelatinizados. Para cubrir los cortes, se sumergieron en un tren de concentraciones ascendentes de etanol (70, 96, 100%) y xilol para deshidratar y se colocó un cubreobjetos usando Entelan como medio de montaje.

#### *ELISA de PGE2 y TNF $\alpha$*

Para la ELISA competitiva se utilizó el kit de la compañía Cayman Chemical (Cat: 514531) para metabolitos de PGE2. Para ello se realizó una purificación del plasma precipitando la proteína con acetona fría y conservando el sobrenadante. Posteriormente se evapora la acetona de esta muestra utilizando un Concentrador 5301 de la marca Eppendorf calentando a 70°C a vacío por 1 hora y se resuspende en buffer de ELISA (incluido en el kit). A esto se le añade 3/10 partes del volumen de buffer de carbonatos (incluido en el kit) y se incuba toda la noche a 37°C. Tras la incubación se acidifica la muestra a pH 4 con buffer de acetatos y se realiza una extracción con acetato de etilo agitando vigorosamente, centrifugando y conservando la fase orgánica. Esto se repite tres veces, reuniendo en un solo tubo el acetato de etilo obtenido por cada muestra. Nuevamente, se evapora el solvente orgánico, como se mencionó anteriormente y se resuspende en la misma cantidad de buffer PGEM (incluido en el kit) que el volumen de la muestra original. Se añaden 50  $\mu\text{l}$  de la muestra problema, 50  $\mu\text{l}$  de trazador y 50  $\mu\text{l}$  de antisuero (ambos incluidos en el kit) a los

pozos de ELISA, los cuales contienen un anticuerpo de captura y se incuban 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lava 5 veces con buffer de lavado (incluido en el kit), se agregan 200  $\mu$ l de reactivo de Ellman (incluido en el kit) por pozo y se incuban 90 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se realiza la lectura en un lector de placas Multiscan FC de ThermoScientific a una longitud de onda de 405 nm.

El TNF $\alpha$  fue cuantificado por el método de ELISA desarrollado en el laboratorio, el cual emplea los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  de R&D Systems, el MAB510R como anticuerpo de captura y el BAF510 como anticuerpo de detección. Para ello se colocan 100  $\mu$ l de una dilución 2  $\mu$ g/ml del anticuerpo de captura en buffer de carbonatos 0.2 M a pH 9.6 en placas Nunc MaxiSorp (ThermoFisher 44-2404-21) y se incuban toda la noche a 4°C. Tras esto se lava la placa dos veces con PBS y se agregan 300  $\mu$ l de buffer de bloqueo (PBS con albúmina al 1% y Tween 20 al 0.05%) y se incuban 2 horas a temperatura ambiente.

Esta placa se incuban toda la noche a 4°C. Posteriormente se lava tres veces con PBS y se agregan 100  $\mu$ l del anticuerpo de detección diluido en buffer de bloqueo a una concentración de 0.2 ng/ml y se incuban 1 hora a temperatura ambiente. Al terminar esto se lava tres veces y se agregan 100  $\mu$ l del conjugado estreptavidina-HRP en buffer de bloqueo a una concentración de 1.25  $\mu$ g/ml y se incuban una hora más a temperatura ambiente.

Para revelar, se lava la placa nuevamente y se añade a cada pozo 100  $\mu$ l de una solución de revelado que contiene 100  $\mu$ g/ml de TMB en buffer de citratos/acetatos (cada uno 0.1 M) a pH 6 y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.03%. Una vez colocado el reactivo de revelado se incuban la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se agregan 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.8 M para detener la reacción y se lee su absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.

### *Extracción de RNA y PCR*

Se extrajo el RNA total de hígado por el método de TRIzol (Gibco-BRL, EUA). Posterior a la perfusión con solución salina isotónica (para evitar contaminación de RNA de células sanguíneas) cada tejido fue extirpado, inmediatamente colocado en TRIzol ( $\approx 1$  ml/0.3 g de tejido) y guardado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Para su procesamiento cada muestra de tejido fue homogenizada en el aparato TissueLyser LT (de Quiagen) agitando a 50 Hz durante 5 minutos y se incubó en hielo por otros 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos y se recuperó la fase acuosa, la cual contiene el RNA. A ésta se agregó 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo, se agitó vigorosamente, se incubó 3 minutos y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos y se vuelve a recuperar la fase acuosa. Posteriormente se agregan isopropanol en una relación 1:1 con la fase acuosa y se incubó 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$  para permitir que el RNA se precipite. Posteriormente se centrifuga a 13,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, se decantó la pastilla y se lavó con etanol al 75% en agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC). Se decanta la pastilla y ésta finalmente es resuspendida en 100  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC. Para aumentar la pureza del RNA se vuelve a precipitar agregando 1/10 parte del volumen de LiCl 4M y 2.5 veces el volumen de etanol al 100%. Se incubó toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se centrifuga a 13,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, se decantó la pastilla y se lavó con etanol al 75% en agua tratada con DEPC. Se decanta la pastilla y ésta finalmente es resuspendida en 100  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC.

Posteriormente se verifica la integridad del RNA por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% y se tiñe con 50  $\mu\text{g}$  de bromuro de etidio por cada 100 ml de gel, el cual se observa irradiando con luz ultravioleta. La fracción de rRNA 28S debe tener el doble de intensidad que el 18S y no debe verse DNA genómico en el pozo. Si las condiciones anteriores no se cumplen, se repite la precipitación con LiCl y etanol al 100%. Una vez hecho esto se cuantifica la cantidad de RNA en la muestra utilizando un nanodrop leyendo a 260/280 nm.

A partir de este RNA se realiza una retrotranscripción utilizando el kit Superscript III first strand mix (Invitrogen, 18080400) agregando a un tubo de PCR de 200  $\mu\text{l}$  5  $\mu\text{g}$  de RNA, 1  $\mu\text{l}$  de primer oligodT (2  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de buffer de alineación y cuanto baste de agua tratada con DEPC para completar 8  $\mu\text{l}$ . Esta mezcla se incubó 5 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$  y posteriormente 1

minuto a 4°C. Posteriormente se añaden 10 µl del buffer 2x strand reaction mix y 2 µl más de agua tratada con DEPC. Esto se incubó 50 minutos a 50°C, terminando la reacción a 85°C por 5 minutos. El líquido obtenido contiene el cDNA y es guardado a -20°C hasta su uso.

Este cDNA es amplificado por PCR tiempo real. Para la reacción por cada muestra se coloca 5 µl de Master Mix Sybergreen, 2 µl de agua milliQ, 1 µl de cada uno de los primers de un stock 10 mM, y 2 µl del cDNA de interés. Los primers utilizados para *TNFα* fueron (en dirección 5'-3') CCAATCTGTGTCCTTCTAA como primer sentido y TTCTGAGCATCGTAGTTG como primer antisentido. Para el gen de la hipoxantina fosforribosiltransferasa (*HPRT*), que se utilizó como gen de referencia debido a que no presenta fluctuaciones circadianas, se usó la secuencia GCCTAAAAGACAGCGGCAAG como primer sentido y GGCTGCCTACAGGCTCATAG como primer antisentido.

De la PCR se obtuvieron los  $\Delta Ct$  y se comparó el de  $\Delta Ct$  de los genes de interés con respecto al gen control.

#### *Análisis de imágenes*

Para la cuantificación de la inmunohistoquímica de c-Fos de los experimentos se tomaron fotografías digitales de los cortes. Se tomaron 4 fotografías bilateralmente de un lado del núcleo del tracto solitario y de cada lado de la asta dorsal de la médula. El número de células positivas a c-Fos se cuantificó usando el programa ImageJ. Se usó la detección automática de elementos con una circularidad de 0.4 a 1.0 y un tamaño de 70 a 700 píxeles para detectar los núcleos positivos para la IHC.

#### *Análisis estadístico*

Los datos cuantitativos se expresaron como la media  $\pm$  el error sobre la media (SEM). De ser posible, en los grupos en los que se contaba con al menos 3 mediciones independientes, se analizaron los resultados mediante una prueba de ANOVA de una vía y con una

comparación múltiple de Tukey o en su caso con una prueba t repetida para analizar los resultados de frecuencia cardiaca. Todo análisis se hizo con el programa GraphPad Prism 6.0.

## 5. Resultados

### *Activación neuronal*

Para evaluar si la PGE2 es capaz de activar al sistema nervioso, se administró una dosis de 100 µg/kg PGE2 por vía intravenosa en ZT2 y se midió la expresión del protooncogén c-Fos como indicador de activación neuronal en neuronas de áreas sensoriales del sistema nervioso autónomo parasimpático y simpático que son el núcleo del tracto solitario (NTS) y la asta dorsal de la médula espinal (DH) respectivamente. 50 minutos después de este reto se pudo observar la presencia de neuronas activas tanto en DH como en el NTS, además de que se obtuvo activación del Área Postrema, el cual es un órgano circumventricular ubicado en el tallo cerebral, lo cual se puede interpretar como que fueron activadas (Fig. 4).

La administración de la dosis baja de LPS, de 2 µg/kg (se considera baja debido a que no genera una reacción febril), también indujo la expresión de c-Fos en el NTS y el DH respectivamente, en ZT2, mientras que esto no se observó en ZT14 (al principio de la fase de actividad, 2 horas después de que se apagaran los focos). También se observa que la administración de indometacina previo a la administración de LPS previene la expresión de c-Fos tanto en el NTS, como en el DH (Fig. 5).

A pesar de que se observó la presencia del marcador de activación neuronal en las áreas sensoriales mencionadas previamente, en ninguna situación se observó dicho marcador en neuronas con función motora del sistema nervioso simpático, es decir en la columna intermedio lateral de la médula espinal, ni parasimpáticos, que son el núcleo dorsomotor del vago ni en el núcleo ambiguo del vago (Fig. 4).

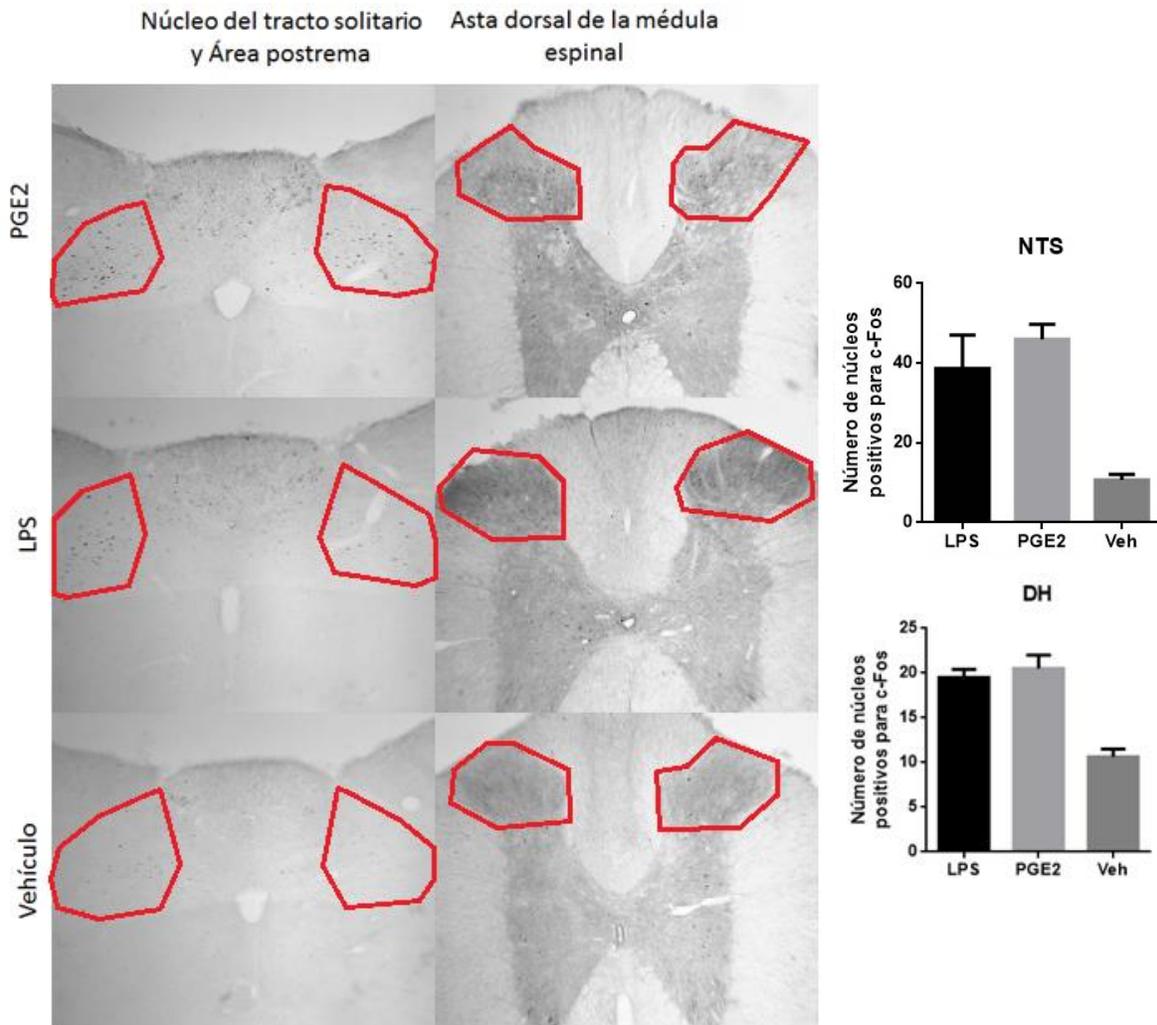
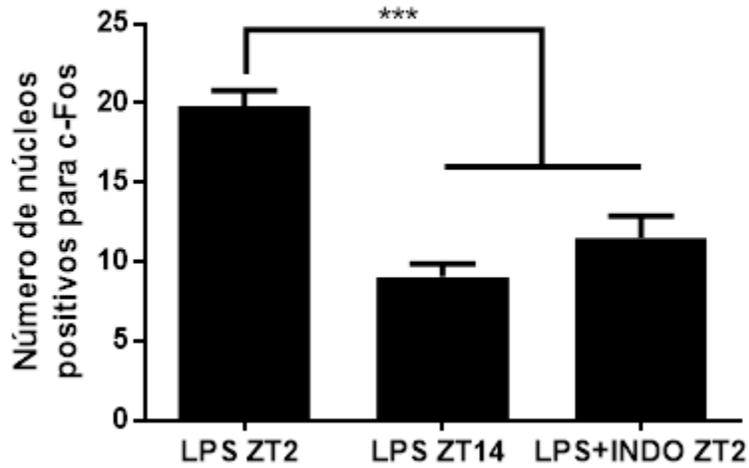


Figura 4. Número de núcleos celulares positivos para una IHC para c-Fos de un solo lado en la asta dorsal de la médula espinal (T7-10) y en el núcleo del tracto solitario 50 minutos tras la administración de LPS o PGE2 en ZT2. A la izquierda se muestran fotografías representativas de las tinciones de inmunohistoquímica de cada grupo marcando en rojo ejemplos de las áreas consideradas. N=2 en el grupo vehículo, 3 en los demás. En la gráfica se presenta el promedio  $\pm$  SEM. No hay diferencia entre el grupo LPS y el PGE2 comprobado con una prueba t.

### A Asta dorsal de la médula espinal



### B Núcleo del tracto solitario

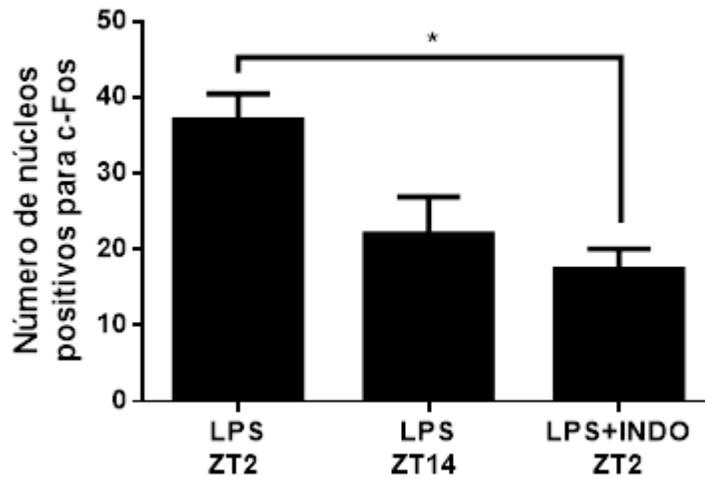


Figura 5. Número de núcleos positivos para una IHC para c-Fos de un solo lado en la asta dorsal de la médula espinal (T7-10) (A) y en el núcleo del tracto solitario (B) 50 minutos tras la administración de LPS con o sin pretratamiento con indometacina. A Se encontró un mayor número de núcleos positivos en ratas a las que se les administró LPS en ZT2 y no cuando administra indometacina previo al LPS B Al igual que en el DH, sólo se encontró un mayor número de núcleos positivas en ratas a las que se les administró LPS en ZT2 y que el tratamiento con indometacina previene la presencia de c-Fos. \* representa  $p < 0.05$  en una ANOVA con una prueba post hoc de Tukey post hoc test,  $N=4-7$ . En la gráfica se presenta el promedio  $\pm$  SEM.

Debido a que el pretratamiento con indometacina en ZT2 previene la activación de las neuronas del DH y del NTS después de la administración de LPS, nos preguntamos si la falta de activación producida por LPS en ZT14 sería consecuencia de que no se estuviera generando PGE2 con esa dosis de LPS en dicho punto temporal.

#### *Concentración de Prostaglandina E2 en plasma*

Al medir la concentración sérica de PGE2 encontramos que no hay diferencia entre la cantidad plasmática de PGE2 en ZT2 y ZT14, y que el pretratamiento con indometacina previene el aumento en los niveles séricos de PGE2 (Fig. 6).

#### *Frecuencia Cardíaca*

Tras la administración tanto de solución salina como de solución salina con LPS, al principio de la fase de descanso de los animales (ZT2, dos horas después de que se prendieron los focos) por vía intravenosa hay un aumento inmediato en la frecuencia cardíaca, la cual regresa a sus valores basales después de aproximadamente 25 minutos. Posteriormente, a los 32.5 minutos se puede apreciar un aumento significativo en los animales que recibieron LPS con respecto a aquellos animales a los cuales sólo se les administró la solución salina. Este aumento se mantiene hasta el minuto 60, tras lo cual la diferencia deja de ser significativa. Como se esperaba, el tratamiento con indometacina 30 minutos previo a la administración de LPS previene el aumento en la frecuencia cardíaca (Fig. 7).

## Respuesta plasmática de PGE2 a LPS

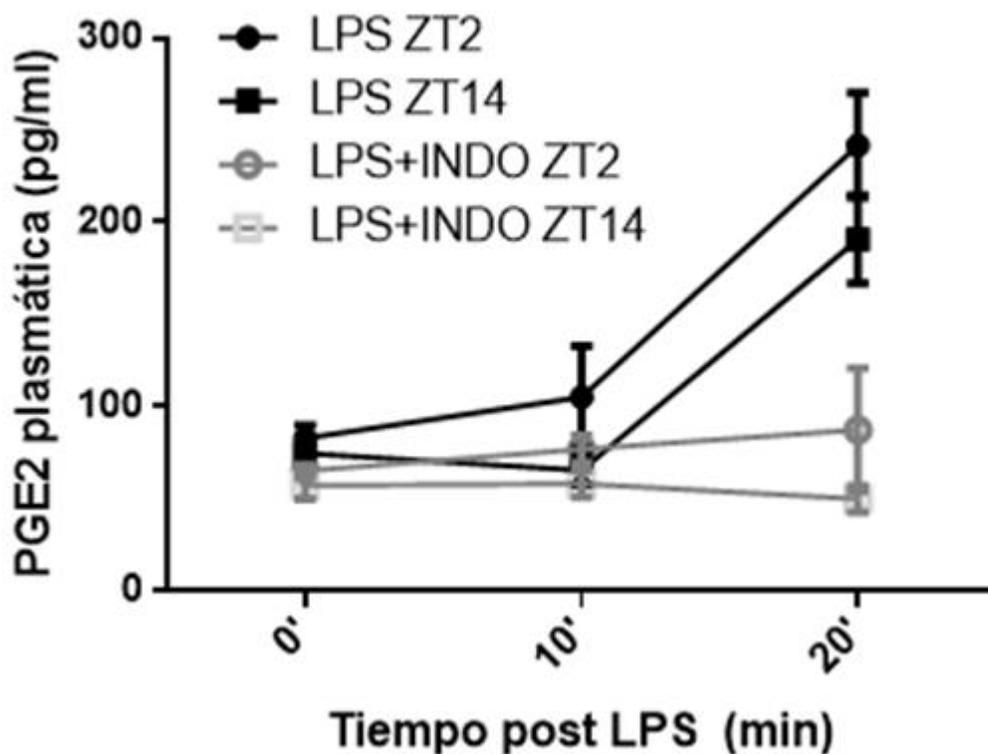


Figura 6. Concentración plasmática de PGE2 tras administrar LPS con o sin pretratamiento con indometacina. Se puede apreciar que la administración de indometacina, tanto en ZT2 como en ZT14 previene el incremento en la producción de prostaglandinas que desencadena la administración de LPS i.v. No se observan diferencias entre la concentración de PGE2 plasmática entre ZT2 y ZT14. \* representa  $p < 0.05$  en una ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey post hoc test comparado las concentraciones sólo a los 20 minutos,  $N=4-6$ . En la gráfica se presenta el promedio  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ .

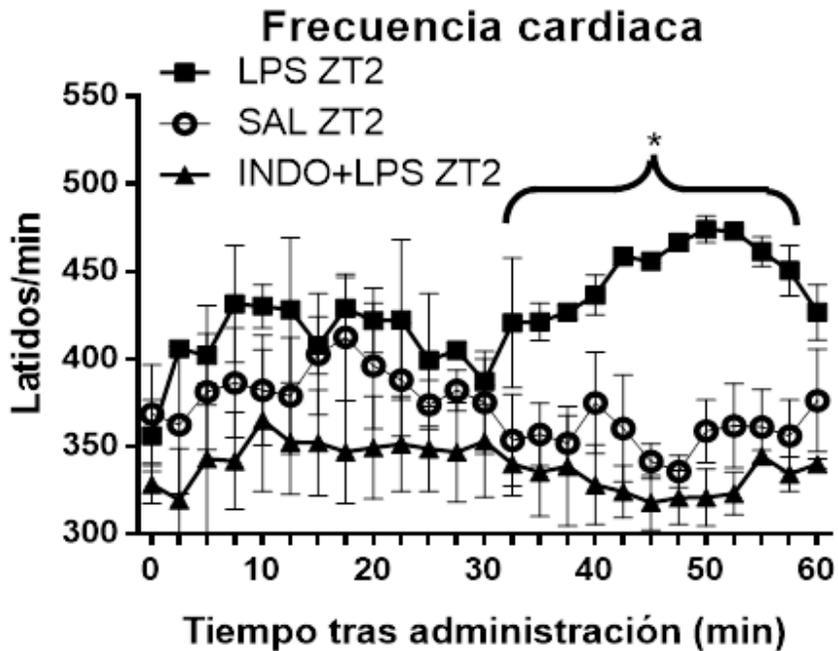


Figura 7. Frecuencia cardiaca tras la administración de 2  $\mu\text{g}$  de LPS por kg de peso corporal en ZT2. Se puede apreciar un aumento estadísticamente significativo a partir del minuto 32.5 comparado con la administración de solución salina, y cómo la indometacina inhibe el aumento de la frecuencia por LPS. \* significa  $p < 0.05$  en una prueba t múltiple,  $N=3$ . En la gráfica se presenta el promedio  $\pm$  SEM.

#### *Concentración de Factor de Necrosis Tumoral alfa en plasma*

Se observó que sólo aquellos animales que recibieron LPS tienen niveles detectables de  $\text{TNF}\alpha$ . De aquellos grupos que recibieron 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS, se puede observar que hay una respuesta menor en el grupo que sólo recibió LPS en ZT2 con respecto a aquellos que recibieron indometacina y LPS en ZT2 y todos los grupos que recibieron LPS en ZT14 (Fig. 8A).

En cuanto a los niveles de mRNA de  $\text{TNF}\alpha$ , se observó que hay una tendencia a que los niveles de mensajero sean mayores en ZT14 con respecto a ZT2, sin embargo, la indometacina no tiene ningún efecto sobre el  $\text{TNF}\alpha$  en hígado en ninguno de los dos puntos temporales (Fig. 8B).

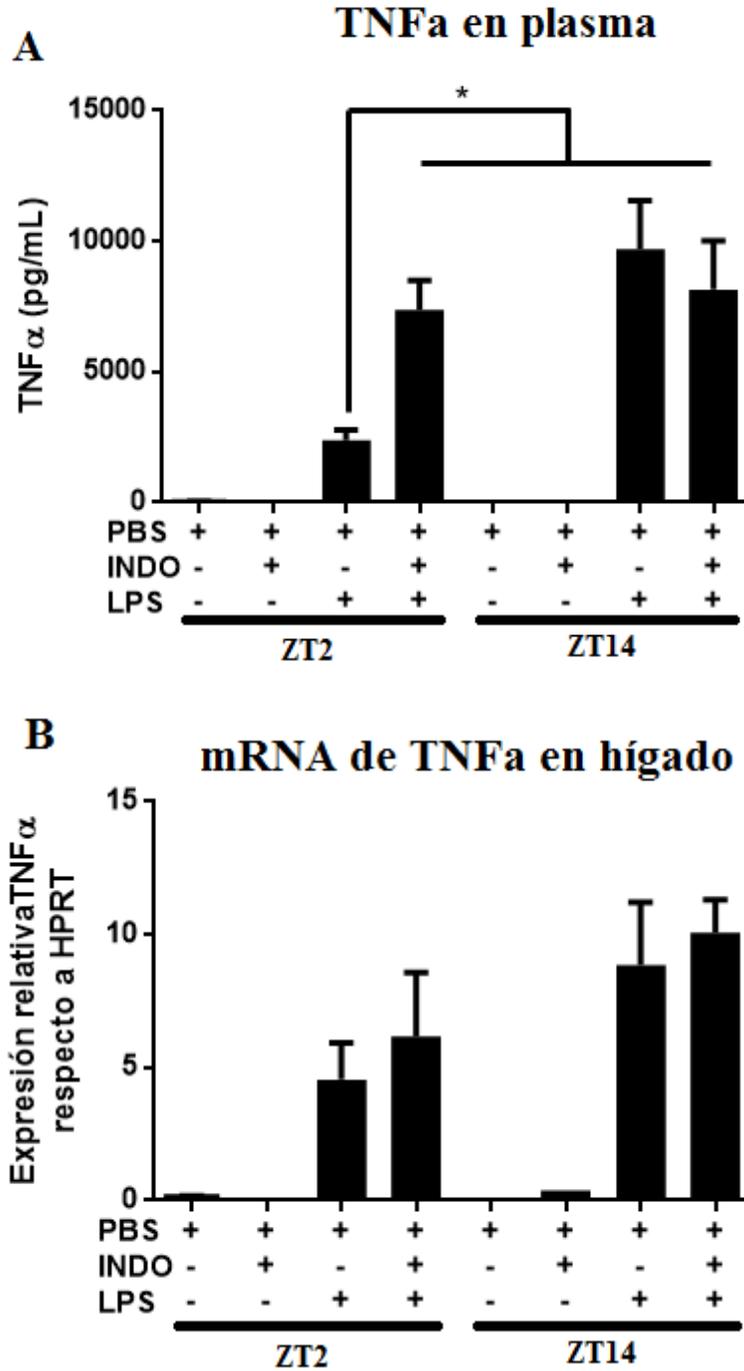


Figura 8. Concentración de TNF $\alpha$  en plasma (A) y de su mRNA en hígado (B) 50 minutos tras la administración de LPS. A Sólo se encontró niveles detectables de TNF $\alpha$  en ratas a las que se les administró LPS en comparación con las que sólo recibieron PBS, N=4-7. B TNF $\alpha$  cuantificado por qPCR en hígado con respecto a un animal control tratado con solución salina. N=3-4. \* representa  $p < 0.05$  en una ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey post hoc test. En la gráfica se presenta el promedio mean  $\pm$  SEM.

## 6. Discusión

Existen diferencias en la respuesta del sistema inmune dependiente del periodo del ciclo circadiano en el cual se reta, siendo mayor los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$  en respuesta a la administración de LPS durante el periodo de descanso que durante el periodo de actividad (Guerrero-Vargas et al., 2014).

Por otro lado, la administración de LPS es capaz de inducir la presencia de c-Fos en el NTS y el DH sólo cuando es administrado al principio de la fase de descanso, específicamente dos horas después de que hay luz (ZT2), pero no así cuando se administra al principio de la fase de actividad (ZT14), es decir, sólo hay activación de dichos núcleos cuando se observan niveles plasmáticos bajos de TNF $\alpha$ .

Se determinó que la administración de una dosis de PGE2 reportada como pirogénica (Ootsuka et al., 2008) induce la activación de estas áreas sensoriales, por lo cual se puede decir que el sistema nervioso es capaz de detectar la PGE2 directamente.

Además, administrar indometacina previo a la administración de LPS previene el aumento en el número de neuronas activadas tanto en el NTS como en el DH en ZT2, que es el periodo temporal donde se observa activación neuronal tras administrar LPS.

Debido a que no observamos activación neuronal cuando se previene la síntesis de PGE2 es poco probable que a la dosis de LPS utilizada sea, por sí misma, capaz de inducir la activación neuronal del NTS ni del DH y que para ello es necesaria la señalización por vía de la PGE2.

El papel de la PGE2 en la activación neuronal tras un reto de LPS ha sido abordada en otros estudios, en donde se utilizan animales transgénicos carentes de la enzima mPGES1, la cual

cataliza la reacción para transformar a la PGH2 en PGE2 (por tanto, no afecta directamente la síntesis de otras prostaglandinas que son esenciales para procesos fisiológicos mencionados en la introducción). En estos animales no hay presencia de c-Fos en muchas áreas sensoriales del cerebro (incluyendo el NTS que se evalúan en este trabajo, aunque no se evaluó el DH), motoras e integradoras a las 3 horas post administración de dosis altas de LPS (de 400 µg/kg) (Dallaporta et al., 2007).

Aunque en el trabajo anterior sugiere la implicación de PGE2 en la comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso el tiempo al cual se evaluó la activación del sistema nervioso debe ser después de 3 horas debido a que la administración de LPS se realizó por vía intraperitoneal y la manipulación de las ratas requerida para realizar la administración por dicha vía induce a tiempos tempranos la presencia de c-Fos. Debido a lo anterior no pueden saber cómo es la activación a tiempos tempranos (menores a una hora).

Cabe aclarar que los posibles resultados utilizando dosis más altas de LPS pueden ser diferentes. En otros estudios en donde se administran dosis de 200 µg/kg de LPS i.p. se ha observado una disminución en el umbral de dolor 5 minutos después de la inyección por lo cual se concluye que probablemente existe algún mecanismo neuronal que detecta directamente el LPS (Watkins et al., 1994). Sin embargo, en estos estudios hay que considerar que la manipulación necesaria para sujetar al animal, así como la punción de una aguja en el peritoneo también pueden jugar un papel importante, variables que se evitaron en este estudio.

Otros estudios abordan el problema de la capacidad de neuronas sensoriales (específicamente del ganglio nodoso, el cual proyecta hacia el NTS) de detectar LPS de manera directa *in vitro*. Estos han demostrado que la concentración mínima necesaria para

inducir un aumento en la concentración intracelular de calcio es de 100 ng/ml de medio de cultivo y que esto sucede en menos de 5 segundos (Meseguer et al., 2014).

Trasladado a un modelo *in vivo* equivaldría aproximadamente a la administración de 7 µg/kg de rata, suponiendo que el 7% del peso del animal se puede considerar como su volumen de sangre (Lee & Blaufox, 1985). Por tanto, existe la posibilidad de que en dosis bajas de LPS sea necesaria la amplificación de la señal por parte de la PGE2. Además, es posible que *in vitro* la dosis mínima de activación sea la observada debido a que bajo el estrés del cultivo se induzca una sobreexpresión de los receptores TRPA1 (Meseguer et al., 2014).

Debido a que no se observó activación de las áreas sensoriales del sistema nervioso tras administrar LPS en ZT14, se planteó la hipótesis de que en este periodo temporal la respuesta de PGE2 a la administración de LPS sería menor.

Al medir la concentración de PGE2 en plasma de animales tratados con LPS en los puntos temporales ZT2 o ZT14, no se encontraron diferencias dependientes de la hora de administración y este incremento ocurre entre los 10 y 20 minutos después de la administración de LPS. En esta medición también se determinó que el tratamiento con indometacina previene el incremento en los niveles séricos de PGE2 en ambos puntos temporales. Debido a esto, debemos considerar que la diferencia en activación del NTS y el DH es debido a diferencias en la susceptibilidad a PGE2 en estos dos periodos temporales.

Se sabe que esta diferencia en susceptibilidad de detección de estímulos por parte del sistema nervioso dependientes del periodo del día ocurre con estímulos de naturaleza variada. Por ejemplo, se ha demostrado que el tiempo de reacción de una rata ante un

estímulo nocivo es diferente durante su fase de actividad que durante su fase de descanso (Kurumaji et al., 1988). En humanos se ha observado que el umbral de estímulo eléctrico necesario para inducir un reflejo de un músculo de la pierna también varía de manera circadiana (Sandrini et al., 1986). Por lo tanto, no debería resultar extraño que esto mismo suceda con la sensibilidad a los niveles plasmáticos de PGE2.

El que no haya diferencia en los niveles séricos de PGE2 en los dos puntos nos permite sugerir que parecería que la capacidad de liberar sustancias a plasma de las células inmunes es igual en ambos puntos temporales, por lo cual de inicio este resultado contrasta con la posibilidad de que el sistema inmune *per se* esté más activo en ZT14 que en ZT2.

Aunque la PGE2 puede ser sintetizada por distintas células del cuerpo (no exclusivamente por células del sistema inmune) consideramos que la principal fuente de PGE2 plasmática es a partir de macrófagos debido a que se ha reportado que la eliminación de macrófagos por la administración de gadolinio i.v. previene tanto el aumento plasmático de PGE2 como la respuesta febril temprana (Li et al., 2005).

Se encontró que la administración de PGE2 por vía intravenosa logra la activación del NTS y el DH. Está reportado que esta dosis puede inducir una respuesta febril a los 4 minutos después de su administración intravenosa (Ootsuka et al., 2008). Debe tomarse en cuenta que esta es una dosis suprafisiológica, pues la concentración hipotética alcanzada en sangre al administrar 100 µg/kg sería de aproximadamente 1500 ng/ml de sangre; mientras que a los 20 minutos el cambio apenas era de 0.1 ng/ml de sangre. Aunque esta diferencia parece alta, debido a que la vida media de la PGE2 en sangre de rata es de apenas 14 segundos (Kozak et al., 2001) si se inyectan 1500 ng/ml de PGE2, a los 3 minutos la concentración sanguínea de PGE2 sería de 0.73 ng/ml.

Al igual que en la respuesta al aumento en los niveles de calcio intracelular, el tiempo de reacción del modelo *in vivo* es mayor al tiempo observado *in vitro* pues se ha observado que *in vitro* las células de Kupffer pueden sintetizar PGE<sub>2</sub> desde los 2.5 minutos después de que se añaden pirógenos al medio de cultivo (Roth & Blatteis, 2014). Nuevamente, esta propensión a reaccionar de manera casi inmediata puede ser debido al estrés bajo el cual se encuentran las células *in vitro* comparado con la condición *in vivo* (Halliwell, 2003).

El que esté afectada la capacidad de detectar el desafío inmunológico por parte del sistema nervioso significa que también habrá diferencias en la respuesta autonómica motora que éste pueda mediar. Para abordar esto se midió la frecuencia cardíaca y los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$  para comparar las condiciones en las cuales se activa el sistema nervioso (LPS en ZT2) con aquellas donde no se activa (LPS en ZT14, y LPS con pretratamiento de indometacina en ZT2).

Apoyando la hipótesis de que las prostaglandinas median esta comunicación temprana entre sistema inmune y sistema nervioso se pudo apreciar un aumento en la frecuencia cardíaca a los 32.5 minutos después de la administración del LPS el cual consistió en un aumento en la frecuencia cardíaca de los animales y, al igual que sucedió con la activación del NTS y el DH, se observó que el pretratamiento con indometacina previno dicho efecto.

Esta observación concuerda en cuanto a tiempo de respuesta con otros estudios en los cuales se ha observado que la administración de una dosis más alta de LPS, de 100  $\mu$ g/kg, logra inducir un aumento en el tono de disparo neuronal del nervio esplénico (el cual es el nervio simpático con comunicación al ganglio celiaco con el bazo) tras 22 minutos (MacNeil et al., 1996).

Aunque en nuestros resultados se observó que el aumento sostenido en la frecuencia cardíaca sucede hasta los 32.5 minutos y no a los 22, este retraso puede deberse a que la dosis que utilizamos es 50 veces menor.

Tomando en cuenta todo lo anterior, se puede concluir que la dosis de LPS administrada no es capaz de activar una respuesta ni sensorial ni motora nerviosa por sí mismo y que para ello es necesaria la síntesis de PGE2.

Se sabe que un aumento en la frecuencia cardíaca es una consecuencia de un aumento en el tono nervioso simpático que recibe el corazón y que este aumento está mediado por noradrenalina (Robinson et al., 1966). Por lo tanto, la administración de LPS aumenta la tasa de disparo del sistema simpático al corazón.

En cuanto a los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$  se pudo apreciar que, también acorde a la hipótesis, en las condiciones en las cuales se activa el sistema nervioso (LPS en ZT2) hay niveles menores de esta citocina con respecto a aquellas donde no se activa (LPS en ZT14, LPS con pretratamiento de indometacina en ZT2, y LPS con pretratamiento de indometacina en ZT14).

Entre estos cabe resaltar el resultado del grupo que recibió LPS con pretratamiento de indometacina en ZT14. En este se puede observar que la falta de PGE2 no exacerbó aún más la respuesta de TNF $\alpha$ , como cabría esperar asumiendo que la PGE2 tiene *per se* actividad antiinflamatoria a niveles fisiológicos. Por lo tanto, al menos en tiempos tempranos tras la administración de LPS, el efecto antiinflamatorio de la PGE2 está mediada por el sistema nervioso.

Tras la activación del sistema nervioso una respuesta común de las neuronas que lo componen es la liberación de neurotransmisores. De éstos, se ha visto que agonistas tanto de noradrenalina, que es el principal neurotransmisor simpático, así como del parasimpático que es la acetilcolina son capaces de disminuir los niveles circulantes de TNF $\alpha$  (Mastronardi et al., 2001) (Borovikova et al., 2000).

Aunque ambas ramas del sistema nervioso autónomo podrían limitar la liberación de citocinas, los datos de mRNA nos proporcionan información adicional sobre esto. Al administrar indometacina, no se observaron diferencias a nivel de mRNA para TNF $\alpha$  en hígado. Esto nos sugiere que, el aumento en la concentración plasmática de TNF $\alpha$  es por falta de norepinefrina, la cual es el principal neurotransmisor del sistema nervioso simpático, y no por acetilcolina debido a que se ha demostrado que la acetilcolina disminuye los niveles de mRNA (Borovikova et al., 2000).

En otros estudios se ha demostrado que la concentración de TNF $\alpha$  en plasma coincide con aquella encontrada en hígado y bazo (Sacco et al., 1998); por lo tanto consideramos válido suponer que la concentración en sangre refleja de manera aproximada la concentración de TNF $\alpha$  en hígado.

Otro efecto conocido de la administración de LPS es la liberación de glucocorticoides por la corteza adrenal y el aumento en los niveles plasmáticos de corticosterona en ratas. Esta respuesta es rápida y puede ocurrir desde los 30 minutos tras la administración de LPS (Buijs et al., 2008). De manera paralela se ha observado que la administración de citocinas también tienen este efecto, y que la administración de indometacina es capaz de prevenir el aumento plasmático de corticosterona (Sharp & Matta, 1993).

Por tanto, es probable que la administración de indometacina también sea capaz de prevenir la liberación de corticosteroides previniendo el aumento en el tono simpático que recibe la glándula suprarrenal (Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005). Debido a la evidencia anterior, proponemos que en hay un aumento en la tasa de disparo del sistema nervioso simpático en todo el cuerpo.

Como conclusión general de este estudio, se propone el modelo en el cual concentraciones bajas de LPS inducen la liberación rápida de PGE<sub>2</sub>, tal vez por macrófagos, la cual a su vez ejerce un efecto antiinflamatorio a través de su detección por fibras nerviosas sensoriales simpáticas, lo cual tendrá como consecuencia un aumento en el tono simpático, que al aumentar los niveles de noradrenalina locales ejerce un efecto antiinflamatorio sobre las células del sistema inmune. En caso de que no se activen las neuronas sensoriales del DH, ya sea debido a una falta de PGE<sub>2</sub> o a que la estimulación con LPS se dio en el periodo de actividad, la respuesta de TNF $\alpha$  será mayor (Fig. 9).

Aunque hay una respuesta autonómica motora debido al aumento observado en la frecuencia cardiaca, no se observó la presencia de c-Fos en áreas motoras ni de la médula espinal (que es el IML), ni del tallo cerebral (que es el DMV). Esto probablemente es debido a que existe un retraso entre la activación de áreas sensoriales y de áreas motoras. Es probable que durante este retraso se lleve a cabo la integración de la información.

Se sabe que la proteína c-Fos puede ser observada por IHC entre 30-45 minutos después de un estímulo (Hoffman et al., 1993), por lo tanto, es lógico que no se pueda observar c-Fos en núcleos de regiones motoras del sistema nervioso autónomo, pues estas áreas probablemente son activadas hasta los 30-35 minutos después del estímulo dado por el LPS, como revela el aumento en la frecuencia cardiaca.

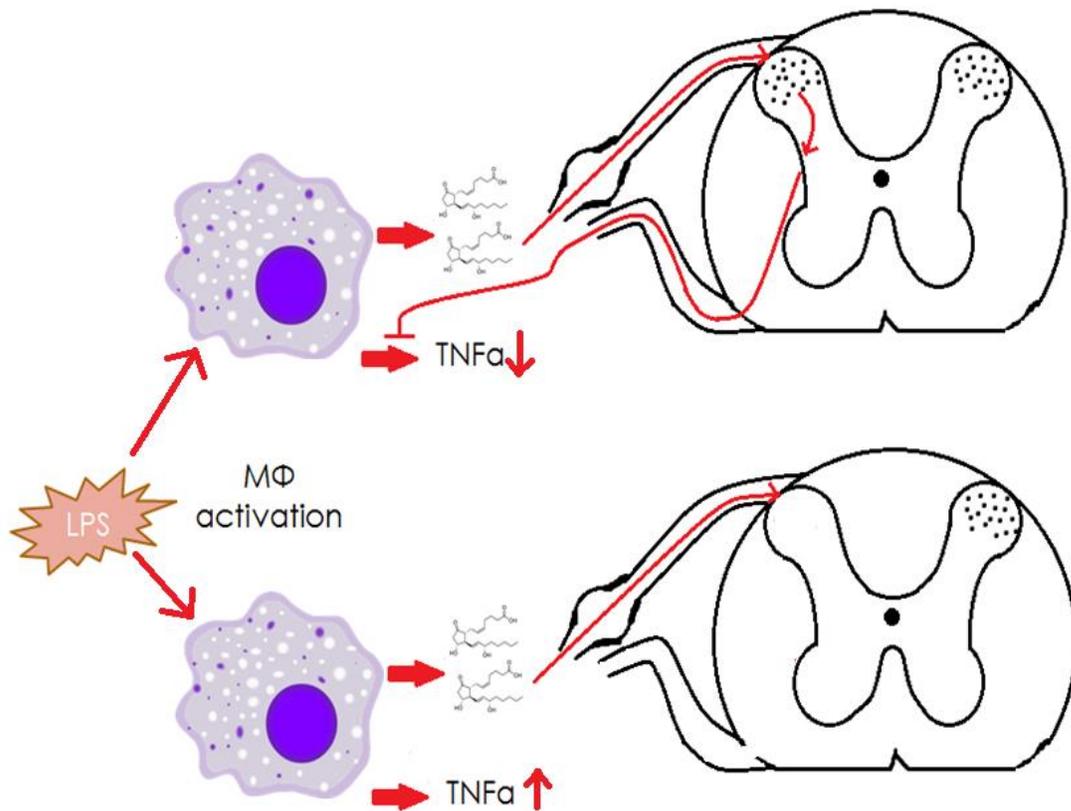


Figura 9. Mecanismo propuesto del reflejo antiinflamatorio simpático. Se propone que el LPS induce la activación de células con capacidad para producir PGE2. Posteriormente, la PGE2 será censada por neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal que a su vez proyecta a la asta dorsal de la médula espinal. Estas neuronas a su vez proyectan a neuronas de la columna intermedio lateral de la médula espinal que proyectan a un ganglio de la cadena simpática, que a su vez proyectan al ganglio celiaco. El ganglio celiaco proyecta a todos los órganos de la cavidad peritoneal, entre ellos el hígado y el bazo secretando norepinefrina. Finalmente, la norepinefrina actúa sobre macrófagos para disminuir la cantidad de TNF $\alpha$  liberado a circulación.

Debido a que se observó que los niveles de PGE2 comienzan a elevarse entre los 10 y los 20 minutos; y que al administrar una dosis elevada de PGE2 i.v. el tiempo de reacción simpática es de 5 minutos (Madden & Morrison, 2004), es probable que las áreas sensoriales comiencen su activación aproximadamente a los 20 minutos, lo cual daría 30 minutos para que haya expresión de c-Fos en las áreas sensoriales.

Cabe mencionar que, en otros experimentos realizados en el laboratorio, los cuales analizan la expresión de c-Fos a los 60 minutos tras una dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  se observa activación

del DMV y el IML (Cázares-Márquez, datos sin publicar). Esto concuerda con que es necesario aproximadamente 30 minutos para la inducción de la presencia de c-Fos en el núcleo de las neuronas involucradas suponiendo que la activación de estas neuronas se da aproximadamente 30 minutos después de la administración del LPS.

Otra posibilidad es que a pesar de que se obtuvo una respuesta simpática, ésta no fue lo suficientemente fuerte como para inducir la presencia de c-Fos en dichas áreas motoras, y para ello sea necesario administrar una dosis mayor de LPS. Esto es apoyado por la observación de que tras 60 minutos la frecuencia cardiaca de los animales a los que se les administró LPS deja de ser diferente a la de aquellos que sólo recibieron solución salina.

El papel de la PGE2 va más allá de una sustancia que se secreta tras la administración de LPS debido a que su síntesis también es inducida por virus (Sander et al., 2017). También se ha observado que la administración de IL1, a una dosis capaz de inducir conductas de enfermedad, son capaces de inducir la síntesis de PGE2 y que en estos animales KO para mPGES1 no hay ni anorexia ni fiebre, aunque se pudo observar una inducción de la síntesis de otras citocinas (Pecchi et al., 2006). Debido a lo anterior, la PGE2 puede iniciar un mecanismo de retroalimentación negativa para la síntesis de citocinas en infecciones de diferente naturaleza.

Las observaciones anteriores indican que probablemente el efecto pirogénico “redundante” entre las citocinas es debido a que las citocinas mismas desencadenan la producción de PGE2. Esto ha sido demostrado *in vitro* con TNF $\alpha$  (Nakao et al., 2002) y con IL1 (Pang & Knox, 1997), pues adicionar estas proteínas induce que las células sintetizen PGE2. También indica que los efectos que tengan las citocinas sintetizados en el sistema nervioso central para conductas de enfermedad también son mediados por PGE2.

El reflejo antiinflamatorio explorado en este trabajo tiene varias implicaciones en cuanto aspectos clínicos de distintas patologías en las cuales se observa de manera concomitante signos clínicos que indican una respuesta alta del sistema nervioso simpático.

Una de estas situaciones sería en sepsis bacterianas donde el 82% de las muertes son causadas por “falla orgánica múltiple” en la cual, en modelos experimentales, valdría la pena discernir qué consecuencias de la administración de LPS son en realidad consecuencia de LPS o de la respuesta inmunológica exacerbada, y cuáles lo son de la respuesta simpática (Daviaud et al., 2015).

Aunque el término “falla orgánica múltiple” pueden ser muchas cosas distintas se ha determinado que la principal causante es la vasoconstricción en combinación con la generación de microtrombos que bloquean la circulación y generan hipoxia en los tejidos (Gustot, 2011).

Por otro lado, se sabe que el aumento el tono simpático, que lleva a la liberación de noradrenalina, puede aumentar la agregación plaquetaria, la coagulación (Ikarugi et al., 1999) y que también tiene propiedades vasoconstrictoras en mamíferos (Hjemdahl et al., 1979).

Esta posibilidad podría ser aceptada o descartada de manera relativamente sencilla determinando si animales transgénicos que carecen de la proteína mPGES1, de los cuales ya existen ratones (Dallaporta et al., 2007), son resistentes a una dosis letal de LPS o si la dosis letal media es mayor con respecto a animales de un fondo genético similar.

En patologías que tienen como agente etiológico a microorganismos están reportados muchos mecanismos de evasión de la respuesta inmune, los cuales permiten a éstos sobrevivir a las condiciones adversas que crea el sistema inmunológico para eliminarlos.

Al respecto, ha sido observado que en modelos de cisticercosis murina utilizando la especie *Taenia crassiceps*, el crecimiento parasitario aumenta cuando se administra PGE2 a los ratones infectados, y dicho crecimiento disminuye cuando se administra indometacina. Esto fue correlacionado con mayores niveles de citocinas inflamatorias (Terrazas *et al.*, 1999). Esta observación podría ser explicada por el mecanismo propuesto en este trabajo, en donde la falta del reflejo antiinflamatorio nervioso exagera la inflamación y el control parasitario por parte del sistema inmune.

Otro parásito que podría aprovecharse de este sistema para evadir la respuesta inmune es *Entamoeba histolytica*, la cual tiene la capacidad de sintetizar PGE2 (Dey & Chadee, 2008).

Por lo anterior, es posible que otros parásitos también aprovechen esta vía de regulación del sistema inmunológico para evadir a la respuesta inmune. Sin embargo, es difícil encontrar la maquinaria enzimática que lleva a cabo la síntesis de productos metabólicos tempranos del sistema inmune, como la PGE2, debido a que no necesariamente es homóloga a aquellas encontradas en mamíferos.

## 7. Conclusiones

- En tiempos tempranos el LPS requiere de las prostaglandinas para activar al sistema nervioso.
- La PGE<sub>2</sub>, por sí misma, tiene la capacidad de activar núcleos sensoriales del sistema nervioso.
- Prevenir la activación del sistema nervioso tiene como consecuencia una exacerbación de la respuesta de TNF $\alpha$ .
- El efecto antiinflamatorio de la PGE<sub>2</sub> probablemente está mediado por el sistema nervioso y no directamente por su censado de células inmunes.

## **8. Perspectivas**

- Determinar si el efecto de inhibición de las prostaglandinas en modular la respuesta inmunológica es consecuencia de la inhibición de su síntesis periférica o en el sistema nervioso central.
- Comprobar que el mecanismo de acción antiinflamatorio de las prostaglandinas en verdad es mediado por noradrenalina proveniente del sistema nervioso.
- Evaluar la relevancia de este circuito de comunicación en circunstancias patológicas como son el síndrome metabólico o modelos de sepsis.
- Determinar si la insensibilidad al LPS en administración crónica es mediado por el sistema nervioso simpático.

## 9. Bibliografía

- Abe, C., Inoue, T., Inglis, M. A., Viar, K. E., Huang, L., Ye, H., ... Guyenet, P. G. (2017). C1 neurons mediate a stress-induced anti-inflammatory reflex in mice. *Nature Neuroscience*, 20, 700–707.
- Ahern, M. J., McFarlane, A. C., Leslie, A., Eden, J., & Roberts-Thomson, P. J. (1995). Illness behaviour in patients with arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 54, 245–50.
- Barajon, I., Serrao, G., Arnaboldi, F., Opizzi, E., Ripamonti, G., Balsari, A., & Rumio, C. (2009). Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 57, 1013–23.
- Bedrosian, T. A., Vaughn, C. A., Galan, A., Daye, G., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2013). Nocturnal Light Exposure Impairs Affective Responses in a Wavelength-Dependent Manner. *Journal of Neuroscience*, 33, 13081–13087.
- Betz, M., & Fox, B. S. (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 146, 108–13.
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., ... Tracey, K. J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405, 458–62.
- Buijs, R. M., van der Vliet, J., Garidou, M.-L., Huitinga, I., & Escobar, C. (2008). Spleen vagal denervation inhibits the production of antibodies to circulating antigens. *PLoS One*, 3, e3152.
- Dallaporta, M., Pecchi, E., Jacques, C., Berenbaum, F., Jean, A., Thirion, S., & Troadec, J. D. (2007). c-Fos immunoreactivity induced by intraperitoneal LPS administration is reduced in the brain of mice lacking the microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1). *Brain, Behavior, and Immunity*, 21, 1109–1121.
- Dantzer, R. (2001). Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 933, 222–34.
- Daviaud, F., Grimaldi, D., Dechartres, A., Charpentier, J., Geri, G., Marin, N., ... Pène, F. (2015). Timing and causes of death in septic shock. *Annals of Intensive Care*, 5, 16.
- de Paiva, V. N., Lima, S. N. P., Fernandes, M. M., Soncini, R., Andrade, C. A. F., & Giusti-Paiva, A. (2010). Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. *Behavioural Brain Research*, 215, 146–151.
- Dey, I., & Chadee, K. (2008). Prostaglandin E2 Produced by *Entamoeba histolytica* Binds to EP4 Receptors and Stimulates Interleukin-8 Production in Human Colonic Cells. *Infection and Immunity*, 76, 5158–5163.

- Eskilsson, A., Matsuwaki, T., Shionoya, K., Mirrasekhian, E., Zajdel, J., Schwaninger, M., ... Blomqvist, A. (2017). Immune-Induced Fever Is Dependent on Local But Not Generalized Prostaglandin E2 Synthesis in the Brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *37*, 5035–5044.
- Fernando Cázarez-Márquez, R. B. (2014). *Análisis de la interacción entre hígado y el núcleo supraquiasmático: vías sensoriales autónomas*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Furuyashiki, T., & Narumiya, S. (2011). Stress responses: the contribution of prostaglandin E2 and its receptors. *Nature Reviews Endocrinology*, *7*, 163–175.
- García-Bueno, B., Madrigal, J. L. M., Pérez-Nievas, B. G., & Leza, J. C. (2008). Stress Mediators Regulate Brain Prostaglandin Synthesis and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Activation after Stress in Rats. *Endocrinology*, *149*, 1969–1978.
- Gerlach, H. (2016). Agents to reduce cytokine storm. *F1000Research*, *5*, 2909.
- Giron, L. T., Crutcher, K. A., & Davis, J. N. (1980). Lymph nodes? A possible site for sympathetic neuronal regulation of immune responses. *Annals of Neurology*, *8*, 520–525.
- Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2005). Science and society: Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature Reviews Immunology*, *5*, 243–251.
- Guerrero-Vargas, N. N., Salgado-Delgado, R., Basualdo, M. D. C., García, J., Guzmán-Ruiz, M., Carrero, J. C., ... Buijs, R. M. (2014). Reciprocal interaction between the suprachiasmatic nucleus and the immune system tunes down the inflammatory response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmunology*, *273*, 22–30.
- Gustot, T. (2011). Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response. *Current Opinion in Critical Care*, *17*, 153–159.
- Halliwell, B. (2003). Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Letters*, *540*, 3–6.
- Hjemdahl, P., Belfrage, E., & Daleskog, M. (1979). Vascular and metabolic effects of circulating epinephrine and norepinephrine. Concentration-effect study in dogs. *The Journal of Clinical Investigation*, *64*, 1221–8.
- Hoffman, G. E., Smith, M. S., & Verbalis, J. G. (1993). c-Fos and Related Immediate Early Gene Products as Markers of Activity in Neuroendocrine Systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *14*, 173–213.
- Ikarugi, H., Taka, T., Nakajima, S., Noguchi, T., Watanabe, S., Sasaki, Y., ... Yamamoto, J. (1999). Norepinephrine, but not epinephrine, enhances platelet reactivity and coagulation after exercise in humans. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *86*, 133–8.
- Kozak, K. R., Crews, B. C., Ray, J. L., Tai, H.-H., Morrow, J. D., & Marnett, L. J. (2001). Metabolism of Prostaglandin Glycerol Esters and Prostaglandin Ethanolamides *in Vitro* and *in Vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, *276*, 36993–36998.

- Kozak, W., Wrotek, S., & Kozak, A. (2006). Pyrogenicity of CpG-DNA in mice: role of interleukin-6, cyclooxygenases, and nuclear factor- $\kappa$ B. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290. Retrieved from <http://ajpregu.physiology.org/content/290/4/R871>
- Kuntz, A., & Richins, C. A. (1945). Innervation of the bone marrow. *The Journal of Comparative Neurology*, 83, 213–222.
- Kurumaji, A., Takashima, M., Ohi, K., & Takahashi, K. (1988). Circadian fluctuations in pain responsiveness and brain Met-enkephalin-like immunoreactivity in the rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 29, 595–99.
- Langhans, W., Harlacher, R., & Scharrer, E. (1989). Verapamil and indomethacin attenuate endotoxin-induced anorexia. *Physiology & Behavior*, 46, 535–9.
- Lee, H. B., & Blaurock, M. D. (1985). Blood volume in the rat. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 26, 72–6.
- Li, Z., Perlik, V., Feleder, C., Tang, Y., & Blatteis, C. M. (2005). Kupffer cell-generated PGE2 triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290, R1262–R1270.
- Livett, B. G., Geffen, L. B., & Austin, L. (1968). Axoplasmic Transport of <sup>14</sup>C-Noradrenaline and Protein in Splenic Nerves. *Nature*, 217, 278–279.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42, 145–151.
- Ma, W., Chabot, J.-G., Vercauteren, F., & Quirion, R. (2010). Injured nerve-derived COX2/PGE2 contributes to the maintenance of neuropathic pain in aged rats. *Neurobiology of Aging*, 31, 1227–1237.
- MacNeil, B. J., Jansen, A. H., Greenberg, A. H., & Nance, D. M. (1996). Activation and selectivity of splenic sympathetic nerve electrical activity response to bacterial endotoxin. *The American Journal of Physiology*, 270, R264-70.
- Madden, C. J., & Morrison, S. F. (2004). Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamus mediate prostaglandin-evoked thermogenesis in brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286, R320–R325.
- Martelli, D., Yao, S. T., McKinley, M. J., & McAllen, R. M. (2014). Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. *The Journal of Physiology*, 592, 1677–86.
- Mastrorandi, C. A., Yu, W. H., & McCann, S. (2001). Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha release is controlled by the central nervous system. *Neuroimmunomodulation*, 9, 148–56.
- Matsuoka, Y., Furuyashiki, T., Yamada, K., Nagai, T., Bito, H., Tanaka, Y., ... Narumiya, S. (2005). Prostaglandin E receptor EP1 controls impulsive behavior under stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

102, 16066–71.

- Meseguer, V., Alpizar, Y. A., Luis, E., Tajada, S., Denlinger, B., Fajardo, O., ... Viana, F. (2014). TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nature Communications*, 5, 3125.
- Mueller, D. L. (2003). Tuning the immune system: competing positive and negative feedback loops. *Nature Immunology*, 4, 210–211.
- Nakao, S., Ogtata, Y., Shimizu, E., Yamazaki, M., Furuyama, S., & Sugiya, H. (2002). Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 238, 11–8.
- Nakayama, T., Mutsuga, N., Yao, L., & Tosato, G. (2006). Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 79, 95–104.
- Neuroimmune communication. (2017). *Nature Neuroscience*, 20, 127–127.
- Norjavaara, E., & Rosberg, S. (1986). Mechanism of action of prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis: evidence for a rapid effect on the guanine nucleotide binding regulatory component of adenylate cyclase in rat luteal tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 48, 97–104.
- Ogle, C. K., Guo, X., Szczur, K., Hartmann, S., & Ogle, J. D. (1994). Production of tumor necrosis factor, interleukin-6 and prostaglandin E2 by LPS-stimulated rat bone marrow macrophages after thermal injury: effect of indomethacin. *Inflammation*, 18, 175–85.
- Ootsuka, Y., Blessing, W. W., Steiner, A. A., & Romanovsky, A. A. (2008). Fever response to intravenous prostaglandin E2 is mediated by the brain but does not require afferent vagal signaling. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294, R1294–R1303.
- Pang, L., & Knox, A. J. (1997). Effect of interleukin-1  $\beta$ , tumour necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  on the induction of cyclo-oxygenase-2 in cultured human airway smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*, 121, 579–587.
- Pecchi, E., Dallaporta, M., Jean, A., Thirion, S., & Troadec, J.-D. (2009). Prostaglandins and sickness behavior: Old story, new insights. *Physiology & Behavior*, 97, 279–292.
- Pecchi, E., Dallaporta, M., Thirion, S., Salvat, C., Berenbaum, F., Jean, A., & Troadec, J.-D. (2006). Involvement of central microsomal prostaglandin E synthase-1 in IL-1 $\beta$ -induced anorexia. *Physiological Genomics*, 25. Retrieved from <http://physiolgenomics.physiology.org/content/25/3/485.long>
- Renz, H., Gong, J. H., Schmidt, A., Nain, M., & Gemsa, D. (1988). Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *The Journal of Immunology*, 141. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/141/7/2388.long>

- Robinson, B. F., Epstein, S. E., Beiser, G. D., & Braunwald, E. (1966). Control of heart rate by the autonomic nervous system. Studies in man on the interrelation between baroreceptor mechanisms and exercise. *Circulation Research*, *19*, 400–11.
- Roggero, E., Besedovsky, H. O., & del Rey, A. (2011). The role of the sympathetic nervous system in the thymus in health and disease. *Neuroimmunomodulation*, *18*, 339–49.
- Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Parrish, W. R., Ochani, K., Harris, Y. T., Huston, J. M., ... Tracey, K. J. (2008). Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*, 11008–13.
- Roth, J., & Blatteis, C. M. (2014). Mechanisms of Fever Production and Lysis: Lessons from Experimental LPS Fever. In *Comprehensive Physiology* (pp. 1563–1604). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Sacco, S., Agnello, D., Sottocorno, M., Lozza, G., Monopoli, A., Villa, P., & Ghezzi, P. (1998). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs increase tumor necrosis factor production in the periphery but not in the central nervous system in mice and rats. *Journal of Neurochemistry*, *71*, 2063–70.
- Sander, W. J., O'Neill, H. G., & Pohl, C. H. (2017). Prostaglandin E2 As a Modulator of Viral Infections. *Frontiers in Physiology*, *8*, 89.
- Sandrini, G., Alfonsi, E., Bono, G., Facchinetti, F., Montalbetti, L., & Nappi, G. (1986). Circadian variations of human flexion reflex. *Pain*, *25*, 403–10.
- Sharp, B. M., & Matta, S. G. (1993). Prostaglandins mediate the adrenocorticotropin response to tumor necrosis factor in rats. *Endocrinology*, *132*, 269–274.
- Simmons, D. L., Botting, R. M., & Hla, T. (2004). Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews*, *56*. Retrieved from <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/56/3/387>
- Smith, J. B., Araki, H., & Lefer, A. M. (1980). Thromboxane A2, prostacyclin and aspirin: effects on vascular tone and platelet aggregation. *Circulation*, *62*, V19-25.
- Soto-Tinoco, E., Guerrero-Vargas, N. N., & Buijs, R. M. (2016). Interaction between the hypothalamus and the immune system. *Experimental Physiology*, *101*, 1463–1471.
- Steiner, A. A., Ivanov, A. I., Serrats, J., Hosokawa, H., Phayre, A. N., Robbins, J. R., ... Romanovsky, A. A. (2006). Cellular and Molecular Bases of the Initiation of Fever. *PLoS Biology*, *4*, e284.
- Stolina, M., Sharma, S., Lin, Y., Dohadwala, M., Gardner, B., Luo, J., ... Dubinett, S. M. (2000). Specific Inhibition of Cyclooxygenase 2 Restores Antitumor Reactivity by Altering the Balance of IL-10 and IL-12 Synthesis. *The Journal of Immunology*, *164*. Retrieved from [http://www.jimmunol.org/content/164/1/361?ijkey=fbcd35e334603569fedd3bb680d3d5e9316b6025&keytype=tf\\_ipsecsha](http://www.jimmunol.org/content/164/1/361?ijkey=fbcd35e334603569fedd3bb680d3d5e9316b6025&keytype=tf_ipsecsha)
- Tanaka, Y., Furuyashiki, T., Momiyama, T., Namba, H., Mizoguchi, A., Mitsumori, T., ...

- Narumiya, S. (2009). Prostaglandin E receptor EP1 enhances GABA-mediated inhibition of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and regulates dopamine level in the dorsal striatum. *European Journal of Neuroscience*, *30*, 2338–2346.
- Teeling, J. L., Cunningham, C., Newman, T. A., & Perry, V. H. (2010). The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications for a role of COX-1. *Brain, Behavior, and Immunity*, *24*, 409–19.
- Terrazas, L. I., Bojalil, R., Rodriguez-Sosa, M., Govezensky, T., & Larralde, C. (1999). *Taenia crassiceps* cysticercosis: a role for prostaglandin E2 in susceptibility. *Parasitology Research*, *85*, 1025–31.
- Thorens, B. (2011). Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *13*, 82–88.
- Triplitt, C. L. (2012). Examining the mechanisms of glucose regulation. *The American Journal of Managed Care*, *18*, S4-10.
- Vidensky, S., Zhang, Y., Hand, T., Goellner, J., Shaffer, A., Isakson, P., & Andreasson, K. (2003). Neuronal Overexpression of COX-2 Results in Dominant Production of PGE2 and Altered Fever Response. *NeuroMolecular Medicine*, *3*, 15–28.
- Watkins, L. R., Wiertelak, E. P., Goehler, L. E., Mooney-Heiberger, K., Martinez, J., Furness, L., ... Maier, S. F. (1994). Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. *Brain Research*, *639*, 283–299.