



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

VARIACIÓN DIURNA EN LA RESPUESTA MOTORA, Y EN LA
HISTOPATOLOGÍA CEREBRAL EN UN MODELO DE TRAUMATISMO
CRANEOENCEFÁLICO EN RATA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
Med. Cir. Ricardo Jesús Martínez Tapia

DIRECTORA DE TESIS:
Dra. María de la Luz Navarro Angulo
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR:
Dra. Anahí Chavarría Krauser
FACULTAD DE MEDICINA

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdez
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CDMX, NOVIEMBRE, 2021



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.

DEDICATORIA

A mi mamá Marisol por darme la vida, porque tú me has apoyado, has sido mi consejera, mi escucha y cómplice en todo momento, y porque me has alentado a cumplir mis sueños, eres mi gran ejemplo y mi orgullo. A mis abuelos por ser mis pilares más importantes. Abuela Hilda, tú me enseñaste a leer, sin esa herramienta tan importante no habría llegado hasta donde estoy. Abuelo Roberto, tú me enseñaste a que la disciplina es esencial para lograr nuestros objetivos. A mi tío Beto, porque fuiste la primera persona que me habló y me enseñó de esta forma de vida tan maravillosa llamada “ciencia”. A ustedes cuatro ¡Los amo!

A la Dra. Luz Navarro, mi madre académica, por ser una gran mentora y por confiar en mí en todo momento. Al Dr. Francisco Estrada, por ser un gran amigo y consejero, fue una gran ayuda en momentos difíciles. A mi segundo hogar, el Laboratorio de Neuroendocrinología y sus miembros, a la Dra. Marina, Adán, Graciela, Roxana, Perla y Teresita.

A Alex, manito, mi gran compañero de locuras y mi confidente, gracias por todos esos ánimos y esos tacos que siempre me aclaraban la mente. A Toño, mi hermanito académico del doctorado, porque esos debrayes científico-filosóficos son únicos. A Elvis por siempre apoyarme. A José “Chinos” por ser un gran consejero y amigo. A Paty, Julio y Silvia, porque siempre me sacaban de mi mundo. Todos ustedes son las y los hermanitos que esta vida me obsequió. Los quiero.

A todos mis estudiantes de pregrado del laboratorio de Fisiología, siempre eran el respiro en un día ajetreado. A mis alumnos de investigación, Alejandro, Reinhard, Edgar, Karina, Mariem, Karla y en especial a Stephy, quien más que mi alumna eres una gran amiga. Gracias por dejarme enseñarles un poco de mi pasión, continúo aprendiendo mucho de ustedes.

Al LFSIPM y a todos sus integrantes. Al Dr. Armando Pérez Torres por ser la caballería necesaria para este proyecto, pero sobretodo por ser un gran amigo, consejero y mentor al enseñarme en cada plática en el laboratorio la otra forma de vivir y de apasionarme por la ciencia. A Eve, por volverte una gran amiga, consejera y sobretodo guía. A Verito, por ayudarme con la histología de mi proyecto, tus tinciones son una obra de arte. Los quiero montones a los tres.

A la Mtra. Concepción Rugerio y Vargas (†) y a la Dra. María Marcela Ramírez Escoto, con ambas aprendí lo básico de un laboratorio y sobretodo lo apasionante de las neurociencias. Considero un privilegio haber estado en su laboratorio, haber observado sus impregnaciones metálicas y que sembraran en mi las primeras dudas de esta tesis y de esta célula tan hermosa, la microglía ¡GRACIAS!

A Yaz, por ser la voz de la razón en momentos de angustia y desesperación, por mostrarme que nunca es tarde para lograr tus objetivos, por esas pláticas atemporales, retadoras, profundas, pero sobretodo, por esos ojos y esa sonrisa que han iluminado estos días tan largos de escritura de la tesis ¡Te amo! También, gracias a tu linda y generosa familia, a tu mamá, tu hermano, tu tía y tu abuelo los aprecio mucho.

Finalmente, a todas esas personas que he conocido a lo largo de esta travesía y que no aparecen aquí, a todas y todos ustedes jamás me alcanzarán las palabras para expresarles mi gratitud, sin duda alguna contribuyeron con ese granito de arena por el cual este sueño se pudo completar.

*“El secreto para llegar es muy sencillo; se reduce a dos palabras:
trabajo y perseverancia”.*

Santiago Ramón y Cajal

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma mater*, porque en ella uno puede realizar sus sueños.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme beneficiado con una beca (594665) durante todo mi doctorado y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo con los proyectos: IN223417 e IN228320. De igual forma, al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por aceptarme durante los 5 años de esta aventura.

Al Laboratorio de Neuroendocrinología, al Departamento de Fisiología y a la Facultad de Medicina por haberme permitido llevar a cabo todos los experimentos del proyecto en sus instalaciones.

A la Dra. María de la Luz Navarro Angulo por su confianza en este proyecto y por haberme apoyado con los recursos necesarios.

A mi comité tutorial, a la Dra. Anahí Chavarría Krauser por su apoyo cada semestre y por haber sido mi maestra y sobretodo una gran consejera en estos años; de igual forma al Dr. Ignacio Terrazas Valdez por su apoyo y consejo en cada tutorial.

Al Dr. Francisco Estrada Rojo por su gran apoyo con el modelo del TCE, su orientación y su actitud y recomendaciones siempre críticas.

Al Dr. Armando Pérez Torres por sus recomendaciones en el análisis histopatológico y morfológico de este proyecto, y a sus técnicas Verónica Rodríguez Mata y Evelyn Pulido Camarillo por su apoyo con la técnica histológica.

A Marco Antonio Aguilar Urbano de la Unidad de Patología del Centro Médico Nacional S. XXI, por su apoyo con la realización de las inmunohistoquímicas.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	9
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	16
2. TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO	17
2.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN	17
2.2 EPIDEMIOLOGÍA	18
2.3 FISIOPATOLOGÍA.....	20
2.3.1 <i>Daño primario</i>	20
2.3.2 <i>Daño secundario</i>	22
2.3.3 <i>Respuestas celulares al TCE</i>	24
2.4 NEUROPROTECCIÓN.....	29
2.5 NEUROPROTECCIÓN ENDÓGENA	30
3. VARIACIÓN DIURNA.....	31
3.1 RITMOS BIOLÓGICOS Y VARIACIÓN DIURNA	31
3.2 VARIACIÓN DIURNA DE LAS ENFERMEDADES.....	32
3.3 VARIACIÓN DIURNA DEL DAÑO SECUNDARIO	32
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
5. HIPÓTESIS	34
6. OBJETIVOS.....	35
6.1 OBJETIVO GENERAL	35
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
7. METODOLOGÍA.....	36
7.1 SUJETOS EXPERIMENTALES.....	36
7.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	36
7.3 MODELO DE TCE.....	37
7.4 EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA MOTORA.....	39

7.4.1	<i>Escala neuroconductual</i>	39
7.4.2	<i>Prueba de cilindro</i>	41
7.4.3	<i>Prueba de caminata en barra</i>	42
7.5	EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y MORFOLÓGICA	43
7.5.1	<i>Procesamiento del tejido y tinciones</i>	43
7.5.2	<i>Inmunohistoquímica</i>	44
7.5.3	<i>Adquisición de imágenes</i>	45
7.5.4	<i>Descripción y análisis histopatológico</i>	45
7.5.5	<i>Análisis de inmunohistoquímica</i>	46
7.6	OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y ELISA	48
7.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
8.	RESULTADOS	49
9.	DISCUSIÓN	84
10.	CONCLUSIONES	93
11.	PERSPECTIVAS	94
12.	REFERENCIAS	96
13.	ARTÍCULOS ANEXOS Y TRABAJOS EN CONGRESOS	113

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Agua destilada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análisis de varianza (por sus sigla en inglés)
BHE	Barrera hematoencefálica
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
CC	Cuerpo calloso
Ca²⁺	Calcio
cm	centímetro
Cx	Corteza cerebral
D_B	Dimensión fractal
DAB	Diaminobenzidina
DAMP's	Patrones moleculares asociados a daño (por sus siglas en inglés)
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
EVC	Evento vascular cerebral
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés)
g	Gramos
GC	Giro del cíngulo
GD	Giro dentado
GBD	Global Burden of Disease, Injuries and Risk Factors
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (por sus siglas en inglés)
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico

HyE	Hematoxilina y eosina
IL	Interleucina
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
IAM	Infarto agudo al miocardio
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
Iba-1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (por sus siglas en inglés)
K⁺	Potasio
Lx	Lux
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Na⁺	Sodio
NN	Neuronas normales
NC	Neuronas con cambios
ND	Neuronas en degeneración
NMDA	N-metil-d-aspartato
O₂	Oxígeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
PRR	Receptores de reconocimiento de patrón (por sus siglas en inglés)
pH	Potencial de hidrogeniones
SB	Sustancia blanca
SEM	Error estándar de la media (por sus siglas en inglés)
SNC	Sistema nervioso central
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
TA	Temperatura ambiente
TCE	Traumatismo craneoencefálico
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
°C	Grados centígrados
µm	Micrómetro
µl	Microlitro

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas:

Tabla		Página
1.	Clasificación clínica del TCE según la Escala de Coma de Glasgow (ECG)	17
2.	Descripción de los parámetros de la escala neuroconductual de 21 ptos.	39 y 40
3.	Criterios para el conteo celular basados en la morfología neuronal.	46
4.	Protocolo aplicado para el análisis de las fotomicrografías con IBA-1+	47
5.	Análisis por parámetro de la escala neuroconductual de 21 ptos.	54

Figuras:

Figura		Página
1.	Incidencia del TCE por regiones de la OMS.	19
2.	Representación esquemática de la fisiopatología del daño primario del TCE.	21
3.	Representación esquemática de la fisiopatología del daño secundario del TCE.	23
4.	Funciones de la microglía después de una lesión cerebral.	28
5.	Diagrama del diseño experimental empleado.	37
6.	Modelo del TCE utilizado en el laboratorio.	38
7.	Prueba de cilindro.	41
8.	Prueba de caminata en barra.	42
9.	Imágenes de la secuencia de pasos del protocolo aplicado a las fotomicrografías con Iba-1 ⁺ .	47
10.	La hora del día en que se induce el TCE determina la respuesta en la ingesta de comida de la rata.	49
11.	La hora del día en que se induce el TCE determina la respuesta en el peso corporal de la rata.	50
12.	Puntaje de la escala neuroconductual dependiendo de la hora de inducción del TCE.	52
13.	Puntaje de la prueba de cilindro dependiendo de la hora de inducción del TCE.	55

14.	Análisis de la colocación de cada pata en la prueba de cilindro.	56
15.	Análisis de la prueba de caminata en barra según la hora de inducción del TCE.	57
16.	Observación macroscópica de cerebros de rata con inducción del modelo de TCE.	59
17.	Histopatología “panorámica” de cortes sagitales de cerebro de rata con TCE a diferentes horas del día.	60–61
18.	Histopatología con HyE de la zona perilesional al TCE (corteza motora [M1]).	64–65
19.	Histopatología con Nissl de la zona perilesional al TCE (corteza motora [M1]).	66
20.	Histopatología con HyE de la subregión de hipocampo CA1.	68
21.	Histopatología con Nissl de la subregión de hipocampo CA1.	69
22.	Histopatología con HyE de la subregión de hipocampo GD.	71
23.	Histopatología con Nissl de la subregión de hipocampo GD.	72
24.	Histopatología con HyE de las subregiones de hipocampo CA2/3.	73
25.	Histopatología con Nissl de las subregiones de hipocampo CA2/3.	74
26.	Histopatología con Kluver-Barrera de las estructuras de SB subcorticales a la zona del TCE.	75
27.	Histopatología con Kluver-Barrera del cuerpo calloso (CC).	76
28.	Histopatología con Kluver-Barrera del giro del cíngulo (GC).	77
29.	Análisis morfométrico de la microglía con Iba-1 ⁺ en corteza.	79
30.	Análisis morfométrico de la microglía con Iba-1 ⁺ en hipocampo.	80
31.	Inmunomarcaje de la respuesta astrocitaria (GFAP+) en la zona perilesional (corteza motora [M1] al TCE.	82
32.	Inmunomarcaje de la respuesta astrocitaria (GFAP+) en la zona de daño secundario (hipocampo) al TCE.	82
33.	Cuantificación de IL-1 β en hipocampo.	83
34.	Figura de comparativa entre microglía y macrófagos.	90

RESUMEN

El traumatismo craneoencefálico (TCE) es un gran problema de salud pública que necesita ser estudiado, principalmente, debido a las consecuencias que se generan en los pacientes que sufrieron algún tipo de trauma. Para su estudio, se ha descrito que el TCE induce dos tipos de daño: primario y el secundario; y la perpetuación a largo plazo de los procesos fisiopatológicos del daño secundario, tiene consecuencias deletéreas para la función neuronal y la supervivencia neuronal.

En literatura previa, mediante datos conductuales mostramos que existe una variación diurna en el daño ocasionado por un TCE; encontramos una menor susceptibilidad al daño en ratas sometidas a un TCE de similar magnitud durante la noche en comparación con ratas traumatizadas durante el día. Sin embargo, aún necesitamos dilucidar si la variación diurna fisiológica en el microambiente cerebral influye en el daño instaurado y, si está acompañada de efectos neuroprotectores.

En este trabajo, en un modelo de TCE en rata, evaluamos los efectos inducidos por el trauma en dos puntos de tiempo diferentes del ciclo luz – oscuridad. Valoramos las respuestas de comportamiento mediante una escala neuroconductual de 21 puntos, la prueba de cilindro y de caminata en barra y encontramos que las ratas que fueron sometidas al trauma durante las horas de oscuridad presentaron un mejor comportamiento conductual que las que tuvieron el trauma durante las horas de luz. Después, evaluamos el daño histopatológico en diferentes regiones del sistema nervioso central mediante tres diferentes tinciones y observamos que las ratas con un menor daño morfológico en la zona perilesional (corteza cerebral), y en ciertas áreas del hipocampo (CA1 y giro dentado) resultaron menos propensas a sufrir daños que otras (CA2/3), en ratas que fueron sometidas a la lesión cerebral durante las horas de oscuridad. Finalmente, al analizar la respuesta de la microglía y de los astrocitos, encontramos que la microglía mostró diferencias en su ramificación en los grupos Sham, pero no en los grupos con TCE, describimos

diferencias histopatológicas que se asociaron en el hipocampo con una menor cantidad de IL-1 β en los grupos con trauma inducido durante la noche.

Nuestros resultados sugieren que la variación diurna es un determinante crucial en el pronóstico posterior a un traumatismo craneoencefálico y por lo tanto debería ser considerada para futuras investigaciones, en donde se considere el momento del día en que ocurre la lesión.

ABSTRACT

Traumatic brain injury is a great public health problem that needs to be studied, mainly due to the consequences of patients who suffer some type of trauma. It has been described that a TBI induces two types of brain damage: primary and secondary. The long-term perpetuation of the pathophysiological processes of secondary damage has deleterious consequences for neuronal function, survival and the organism's functionality.

Previous literature has described the influence that biological rhythms have on the occurrence of certain diseases. In fact, previously in our laboratory, using behavioral data, we found a diurnal variation in the damage caused by TBI with a lower susceptibility to damage in rats subjected to trauma during the night compared to rats subjected during the day. However, we still need to elucidate whether the physiological diurnal variation in the brain microenvironment influences the established damage and if neuroprotective effects accompany it.

In this work, using a model of traumatic brain injury in a rat, previously established in our laboratory, we evaluated the effects induced by trauma at two different points of time of the light–dark cycle. We evaluated behavioral responses using a 21-point neurobehavioral scale, the cylinder test, and the beam walking test. We found that rats subjected to trauma during the dark hours had a better behavioral performance than those injured during the light hours. Then, histopathological damage was evaluated in different regions of the central nervous system using three different stains. We observed that rat with less morphological damage in the perilesional zone (cerebral cortex) and specific areas of the hippocampus (CA1 and dentate gyrus) were less prone to damage than others (CA2/3) in rats that were subjected to brain injury during the dark hours. Finally, we analyzed the response of microglia and astrocytes. We found that microglia showed differences in branching in the Sham groups but not in the TBI groups. In the hippocampus, we described

histopathological differences that were associated with a lower amount of IL-1 β in the rats with TBI induction at night.

Our results suggest that diurnal variation is a crucial determinant in the outcome after a TBI. The time of day when an injury occurs should be considered for future research.

Life is fragile, to be hurt is part of the game.

Thousands of years later, trauma is just as inevitable: coping with this reality is one of our chores.

But then, injury has also helped to shape life itself, by eliminating the unfit. It has left imprint in our tissues, even in our cells, in the form of built-in, life savings reactions, ready to be triggered at an instant's notice. And myriads of wounds have become stepping stones to one of man's greatest creations – the art of healing.

Guido Majno
The Healing Hand (1975)

1. INTRODUCCIÓN

La palabra *trauma*, de acuerdo con el diccionario de la lengua española, proviene del griego τραῦμα, que significa “herida” (Real Academia Española, s. f.-a), por lo que *traumatismo* es “una lesión de los órganos o los tejidos por acciones mecánicas externas”, es decir el resultado de un trauma (Real Academia Española, s. f.-b). El *trauma* ha sido uno de los más grandes y complejos problemas al que el ser humano se ha enfrentado y que lo ha acompañado desde sus más remotos orígenes en este planeta (Díaz de León Ponce et al., 2016). De hecho, es tan complejo y multicausal que en la actualidad la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo considera una epidemia desatendida, principalmente en los países en desarrollo (OMS | *Los traumatismos*, s. f.). Por ejemplo, un estudio reciente del grupo “Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors” (GBD) encontró que en 204 países, los accidentes de tránsito (la principal causa de lesiones) ocupaban el séptimo lugar entre las primeras causas de muerte en todas las edades. Sin embargo, para los grupos de edad de 10 – 24 y de 25 – 49 años, estos accidentes de tránsito desde 1990 y hasta el 2019 ocupan la primera causa de mortalidad (Vos et al., 2020).

En México, durante el año 2018, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que las agresiones y accidentes (en los que la principal causa fueron los accidentes de tránsito), ocuparon en ambos sexos, el 5º y 7º lugar de las principales causas de muerte respectivamente; y para los grupos de edad de 15 – 24 y de 25 – 34 años, las agresiones ocuparon la primera causa y los accidentes la segunda causa de mortalidad (INEGI, 2019). Finalmente, uno de los principales tipos de trauma que llegan a presentarse es el traumatismo craneoencefálico (TCE), el cuál no sólo ocasiona el menoscabo de la salud y eventual discapacidad de las personas, sino que también representa una carga para los sistemas de salud y las economías debido a la pérdida de productividad y a los altos costos de atención (James et al., 2019).

2. TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO

2.1 Definición y clasificación

El TCE se define como toda alteración de la función cerebral u otra evidencia de patología cerebral, causada por una fuerza externa (Menon et al., 2010), además, dependiendo de si existe o no fractura del cráneo puede ser clasificado clínicamente como de impacto cerrado (no penetrante) o abierto (penetrante) (Capizzi et al., 2020). De acuerdo con el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, un TCE puede ser ocasionado por un impacto directo al cráneo, por mecanismo de golpe-contragolpe, o por una herida penetrante (Ej.: arma de fuego) (Faul et al., 2010).

Por otro lado, también en clínica es muy común que se clasifique a partir de la puntuación obtenida con la Escala de Coma de Glasgow (ECG) que evalúa y asigna un puntaje específico a tres aspectos, la respuesta ocular (1–4 pts.), la respuesta verbal (1–5 pts.) y la respuesta motora (1–6 pts.) que sumados resultan en una calificación máxima de 15 hasta una mínima de 3. De acuerdo con este puntaje y a otras características clínicas, el TCE se puede dividir en leve, moderado y grave (ver tabla 1) (Pavlovic et al., 2019; Sussman et al., 2018).

Tabla 1. Clasificación clínica del TCE según la Escala de Coma de Glasgow (ECG)			
	Leve	Moderado	Grave
Estructura cerebral en imagen	Normal	Normal o anormal	Normal o anormal
Pérdida de conciencia (duración)	0 – 30 min	30 min – 24 h	> 24 h
Alteración del estado mental (duración)	≤ 24 h	> 24 h	> 24 h
Amnesia pos-trauma (duración)	≤ 1 día	1–7 días	> 7 días
Puntaje en ECG	13–15*	9–12*	< 9*

*Clasificación presentada por el US Department of Veterans Affairs y el US Department of Defense concussion or mild TBI working group. Un paciente que cumple con los criterios en más de una categoría se clasifica en el nivel de gravedad más alto y los pacientes con hallazgos anormales en TAC y/o MRI atribuidos al TCE se clasifican como de mayor gravedad. *Mejor puntaje alcanzado en las primeras 24 horas después del trauma.*

2.2 Epidemiología

El TCE constituye uno de los principales problemas de salud pública en nuestro país y a nivel mundial. Por ejemplo, en México, el último reporte del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) realizado hace más de 10 años, estimó una tasa de mortalidad por TCE en 38.8 por cada 100 mil habitantes, con una relación hombre:mujer de 3:1 y una afectación mayor en el grupo de 15 a 45 años, en el cual la causa más común de trauma fueron los accidentes de tránsito que representaron aproximadamente un 75% de los casos, afectando más a los jóvenes menores de 25 años, motociclistas y personas que manejaban en estado de ebriedad (SINAVE, 2008).

Un estudio realizado a nivel mundial durante el 2016 determinó una media de incidencia de 27,082,033 de casos nuevos de TCE (**Figura 1A**) y una prevalencia de 55 millones de casos. En relación al sexo y al grupo etáreo, se puede observar mayoritariamente en hombres y en ellos se observan tres principales picos de incidencia, entre los 0–10 años, a los 20–30 años y después de los 60 años (**Figuras 1B y C**). Para nuestro país, este grupo de investigación determinó una incidencia de 341 669 nuevos casos y una prevalencia de 658 215 casos (James et al., 2019).

El problema de la gran incidencia y particularmente en estos grupos jóvenes son las consecuencias a largo plazo que genera el TCE. Por ejemplo, una revisión sistemática de 49 estudios concluyó que entre las personas con una “lesión cerebral adquirida” solo el 40.7% regresó a su actividad laboral después de un año y el 40.8% hasta dos años después (van Velzen et al., 2009). Por otro lado, un trabajo que analizó la esperanza de vida de dos cohortes (n = 12,481) de sobrevivientes a TCE's de moderados a graves concluyó que ésta es menor que en la población general y depende de la edad, el sexo y la gravedad de la discapacidad (J. C. Brooks et al., 2015). También, se ha reportado que existe una alta probabilidad de que personas con antecedentes de un TCE, presentan un mayor riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas (Cruz-Haces et al., 2017, p.; Graham & Sharp, 2019). Finalmente, en nuestro país es poca la información que se ha recabado

respecto a las alteraciones a largo plazo; sin embargo, se ha llegado a calcular en aproximadamente unos 20 mil casos de discapacitados al año (Ontiveros et al., 2014).

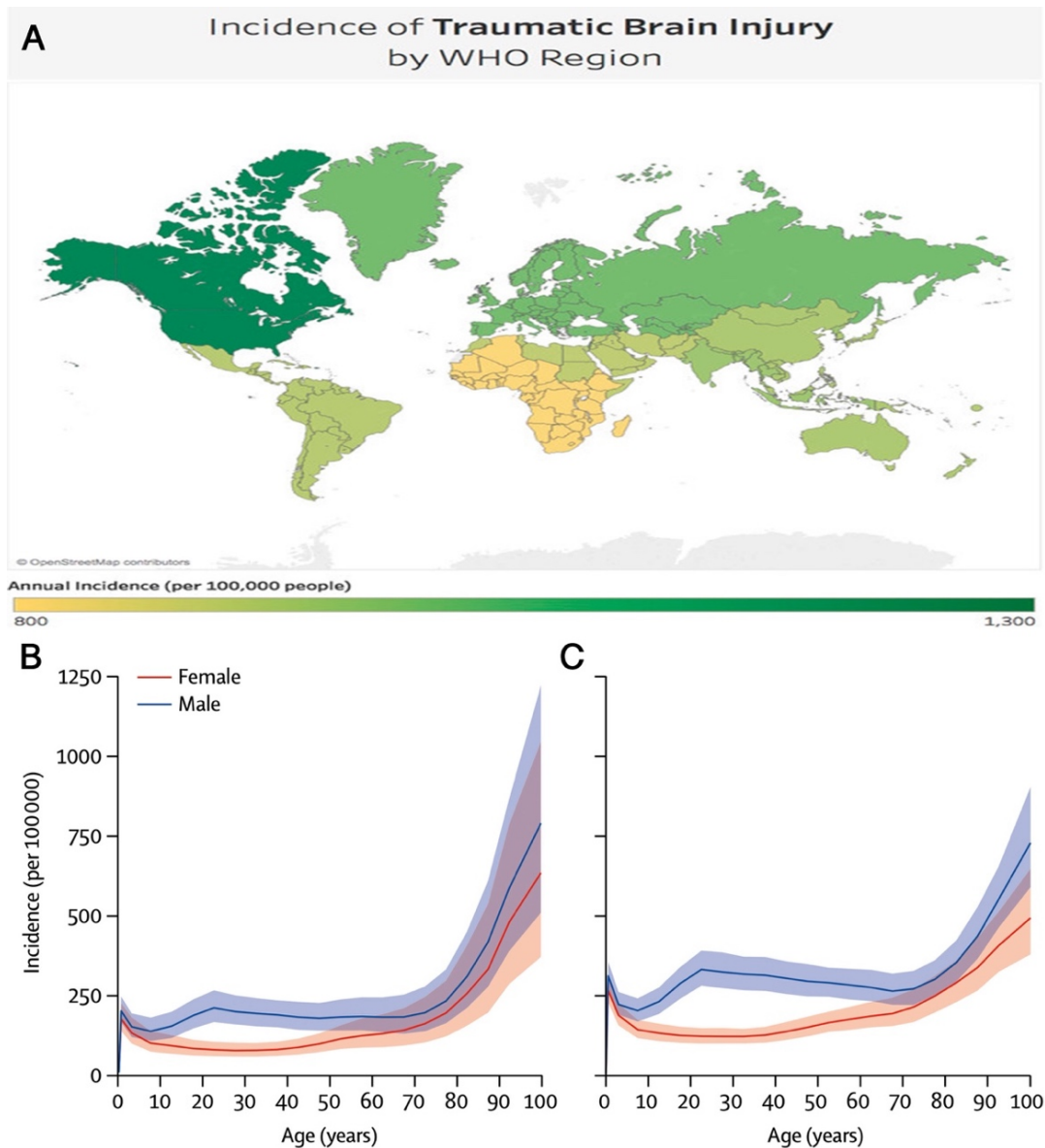


Figura 1. Incidencia anual mundial de TCE por regiones de la OMS; **A)**, e incidencia por sexo en grupos de edad para TCE leve (**B)** y moderado y grave (**C**). Tomado y modificado de: Dewan et al., 2019 y James et al., 2019.

2.3 Fisiopatología

Los mecanismos fisiopatológicos que se activan posterior a un TCE son complejos, tienden a superponerse en el tiempo y la mayoría de ellos se encuentran estrechamente interconectados a pesar de que la literatura los ha llegado a dividir. Sin embargo, para su estudio y con base en modelos de isquemia cerebral y debido entre otras cosas a la gran similitud entre vías que se activan en ambas patologías (Bramlett & Dietrich, 2004; Leker & Shohami, 2002), se han propuesto dos principales tipos de daño, el daño primario y el daño secundario.

2.3.1 Daño primario

Es el daño irreversible ocasionado al momento del impacto, es decir por el intercambio de energía de una fuerza externa con el cráneo que pueden producir deformación del tejido nervioso y alterar el funcionamiento normal del cerebro dañando neuronas, axones dendritas, glía, vasos sanguíneos (Mckee & Daneshvar, 2015) y por lo tanto comprometiendo la integridad y el funcionamiento de la barrera hematoencefálica (BHE). La magnitud del daño primario está determinada por la naturaleza de la lesión, la intensidad, la dirección y la duración de las fuerzas externas que generarán un patrón determinado y una extensión del daño (Maas et al., 2008) (**Figura 2**). Se han descrito dos tipos de lesiones primarias: lesiones focales y difusas.

Lesión focal. Como consecuencia de las laceraciones, las fuerzas de compresión y conmoción cerebral, el TCE cerrado y el penetrante presentan daño focal con evidencia de fractura de cráneo y contusión localizada en el núcleo del sitio de la lesión. El área necrótica de las células neuronales y gliales se concentra en el sitio del golpe con un suministro de sangre comprometido, lo que provoca la aparición de hematomas, hemorragias epidurales, subdurales e intracerebrales en las capas confinadas del cerebro (Ng & Lee, 2019).

Lesión difusa. A diferencia de la lesión focal, el mecanismo principal de la lesión cerebral difusa son las fuerzas de desaceleración y aceleración rápidas, sin contacto

directo, que causan lesiones por corte y estiramiento en el tejido nervioso. Las fuertes fuerzas de tensión dañan los axones neuronales, los oligodendrocitos y la vasculatura, lo que provoca edema cerebral y daño cerebral isquémico. La característica distintiva de lesión difusa es el daño extenso de los axones o daño axonal difuso (DAD) predominantemente en el tejido subcortical y de la materia blanca profunda, en el tallo encefálico y el cuerpo calloso, lo que implica un deterioro del transporte axonal y la degradación del citoesqueleto axonal (Ng & Lee, 2019).

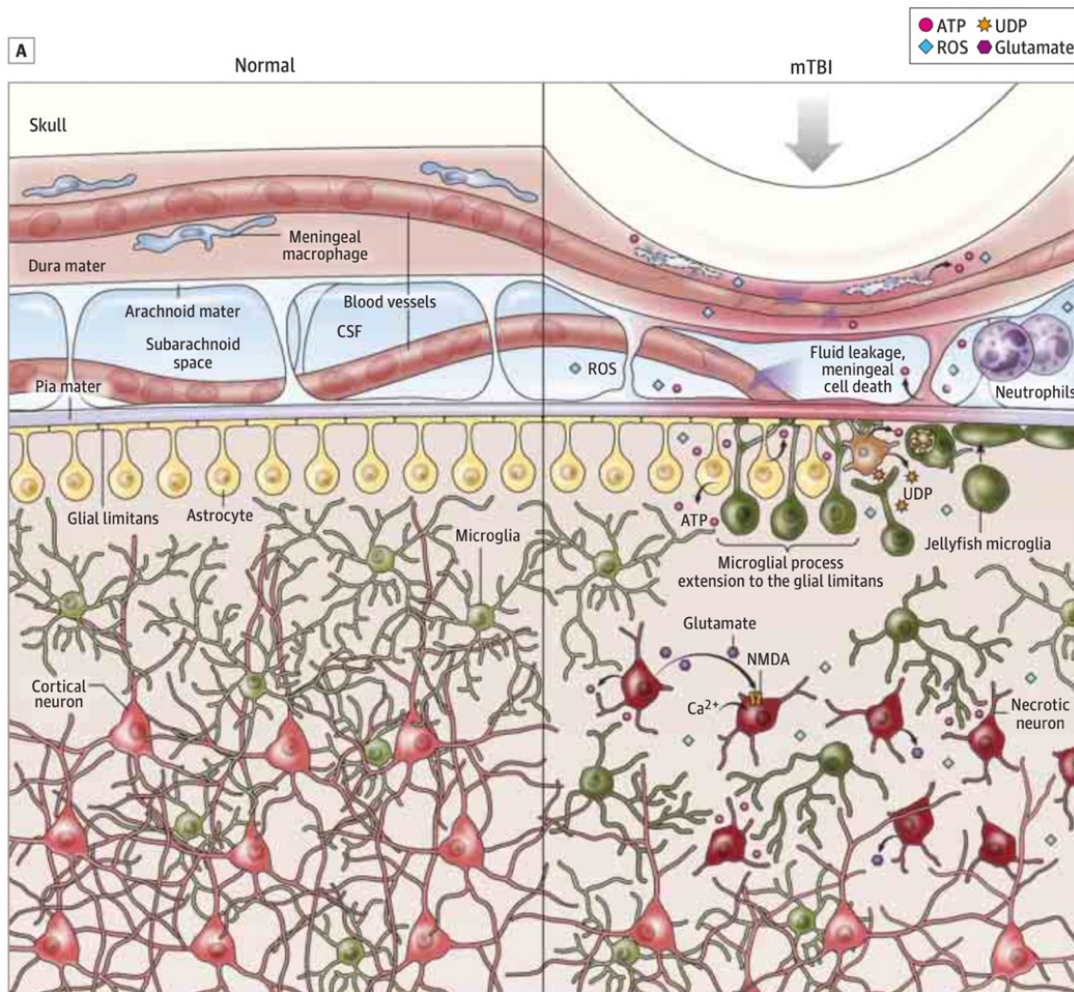


Figura 2. Representación esquemática de la fisiopatología del daño primario del TCE.

Comparación de la anatomía cerebral en las meninges y en la corteza cerebral antes y después de un TCE focal. (A) Análisis histopatológico mediante microscopía confocal ($\times 20$) de la superficie de la corteza cerebral antes (B) y 8 horas después de un TCE (D). Las células muertas fueron marcadas de manera transcraneal con yoduro de propidio, los núcleos celulares son azules. Tomado y modificado de Corps et al., 2015.

Aunque el DAD se presenta en más del 70% de los casos de TCE, algunos estudios han demostrado que la coexistencia de ambos tipos de lesiones primarias es común en pacientes que sufrieron un TCE de moderado a grave (Skandsen et al., 2010).

2.3.2 Daño secundario

Este daño se refiere a todos los mecanismos fisiopatológicos moleculares y celulares retardados y reversibles que pueden evolucionar en cascada y expandirse a partir del sitio de la lesión primaria. Éstos pueden presentarse de horas hasta años, lo que resulta en un mayor daño a la sustancia gris y blanca, y por lo tanto este tipo de daño es el principal responsable del desarrollo de diversas alteraciones neurológicas (Loane & Faden, 2010). A nivel celular, el daño secundario está mediado por vías que incluyen, pero no se limitan a: 1) crisis metabólica, 2) excitotoxicidad, 3) estrés oxidativo y 4) neuroinflamación (Rosenfeld et al., 2012) (**Figura 3**).

Crisis metabólica. El daño primario se acompaña de procesos de isquemia e hipoxia y en estas condiciones la producción de energía se vuelve dependiente de la glucólisis anaeróbica, proceso de producción energética poco eficiente que condiciona la disminución de los niveles de ATP durante los primeros minutos pos trauma (G. A. Brooks & Martin, 2015). Esta disminución del ATP altera el transporte de iones a través de la membrana, principalmente por el fallo de la bomba sodio-potasio ATPasa, lo que lleva a la acumulación de Na^+ intracelular y debido al efecto osmótico de este ión, edematiza la célula (edema citotóxico). Por otro lado, la acumulación de K^+ extracelular y disminución del K^+ intracelular llevan a un potencial de membrana en reposo menos negativo, generando su despolarización lo que lleva a la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje e induciendo la liberación de neurotransmisores (Cheng et al., 2012).

Excitotoxicidad. La excitotoxicidad es definida como el proceso en el cual las neuronas son dañadas como resultado de la sobre estimulación de receptores excitadores como el preferente al N-metil-d-aspartato (NMDA) y al α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), aunque aparentemente en estos últimos depende de la edición post-traduccional del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que el receptor pueda o no ser permeable al Ca^{2+} (Wright & Vissel, 2012). Éstos son canales iónicos activados por ligando que de manera fisiológica permiten el flujo de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} al unirse el glutamato, ocasionando la despolarización de la membrana de las neuronas (Kaur & Sharma, 2018). Derivado de un TCE, la

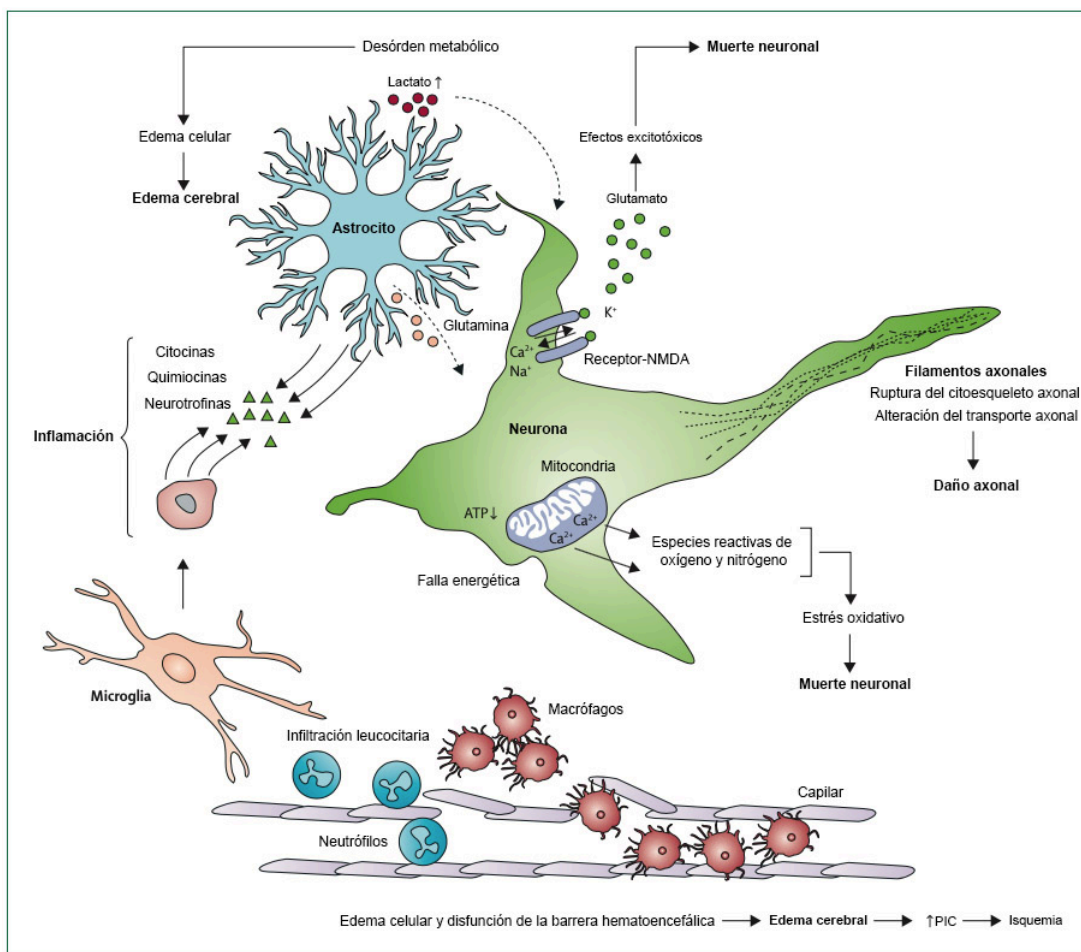


Figura 3. Representación esquemática de la fisiopatología del daño secundario del TCE.

La lesión mecánica primaria al SNC puede causar alteración de la membrana celular, ruptura vascular y daño de la barrera hematoencefálica, seguido de reacciones secundarias que implican desequilibrio iónico, liberación de aminoácidos excitatorios, sobrecarga de Ca^{2+} y disfunción mitocondrial, culminando en vías de muerte celular. Tomado y traducido de Rosenfeld et al., 2012.

ruptura neuronal y la falla metabólica generan una inmensa despolarización neuronal lo que incrementa considerablemente los niveles extracelulares de glutamato, ocasionando un gran influjo de Na^+ y Ca^{2+} a la célula, lo que finalmente lleva a la activación de mecanismos de daño celular derivados de los niveles excesivos de Ca^{2+} (Ng & Lee, 2019; Nilsson et al., 1990; Palmer et al., 1993).

Estrés oxidativo. Es descrito como el desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad del organismo de neutralizarlos a través de los mecanismos antioxidantes. El daño por excitotoxicidad y la depleción de antioxidantes endógenos provocan una excesiva cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) que son los responsables de la oxidación de proteínas, daño al ácido desoxirribonucleico (ADN), peroxidación vascular y celular (ej., peroxidación lipídica de la membrana) y la inhibición de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Cornelius et al., 2013; Kaur & Sharma, 2018). Estos mecanismos son capaces de desencadenar procesos inflamatorios, muerte celular instantánea y procesos iniciales o tardíos de apoptosis.

Neuroinflamación. La respuesta inmune que se caracteriza por activarse en el sistema nervioso central (SNC) posterior a un TCE es considerada como de tipo estéril, ya que posterior al trauma se liberan los denominados patrones moleculares asociados a daño (DAMP's por sus siglas en inglés) los cuales son detectados inicialmente por las células del sistema inmune innato como la microglía (Corps et al., 2015). Esto continúa con una cascada inflamatoria, primeramente de señalización local que incluye a neuronas, astrocitos y que posteriormente se vuelve sistémica al reclutar células del sistema inmune periférico como neutrófilos, macrófagos perivasculares, etc., y eventualmente linfocitos T y B (Jassam et al., 2017).

2.3.3 Respuestas celulares al TCE

Astrocitos. Estas células tradicionalmente han sido consideradas como de soporte a las neuronas debido a que de forma fisiológica, les proveen nutrientes, remueven

productos finales del metabolismo al ser el puente entre los vasos sanguíneos y las neuronas, promueven la homeostasis de diferentes iones como el K^+ , el Cl^- o el Ca^{2+} , y finalmente, a través de sus prolongaciones astrocitarias forman parte de la BHE (Abbott et al., 2006; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Asimismo, son responsables de expresar una gran variedad de receptores tanto de citocinas como de reconocimiento de patrones (PRR's) que al ser expuestos a estímulos inflamatorios son capaces de regular a la alza una gran cantidad de citocinas, quimiocinas y diversos factores tanto pro como antiinflamatorios (Sofroniew, 2014), generando un estado que se define como “reactividad astrocítica” o “astrogliosis” (Escartin et al., 2021).

Como respuesta ante un daño, los astrocitos responden presentando cambios en su morfología, un aumento en la expresión de proteínas de filamentos intermedios, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), nestina y vimentina, un aumento de la proliferación y secreción de mediadores inflamatorios y de factores de crecimiento (Karve et al., 2016). Estos astrocitos reactivos, adquieren una morfología hipertrófica, que implica la extensión de sus procesos y aumento de sus somas celulares (Sofroniew & Vinters, 2010). En el TCE, estas respuestas astrocitarias se activan a la par de los procesos de daño secundario, por ejemplo, ante el aumento de la excitotoxicidad, los astrocitos adquieren un papel importante en la recaptura del glutamato, previniendo su acumulación excesiva en el espacio sináptico (Y. Chen & Swanson, 2003).

Otra característica de la astrogliosis es la formación de la “cicatriz glial”, que actúa como una barrera física, al estar constituida en gran parte por astrocitos reactivos y proliferativos, junto con microglía, células endoteliales, fibroblastos y matriz extracelular. Es conocido que en respuesta al daño o inflamación del tejido nervioso, los astrocitos forman bordes cicatriciales que rodean y encapsulan el tejido dañado e inflamado del tejido nervioso adyacente potencialmente viable (Burda et al., 2016; Karve et al., 2016; Susarla et al., 2014).

Desde una perspectiva muy general, la función de la respuesta astrocitaria al daño ha sido definida tanto en el contexto de la neurodegeneración (daño) como de la neuroprotección (reparación) (Karve et al., 2016). Esto, debido a que los astrocitos reactivos al producir citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias, metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular, ocasionan una mayor disrupción de la BHE, contribuyen a la muerte celular, a la pérdida del tejido neuronal, y a anomalías estructurales y metabólicas que en última instancia conducen a la disfunción neurológica (Carpentier et al., 2005; H. J. Kim et al., 2005). Sin embargo, los astrocitos también son capaces de producir diversos factores para promover la reparación posterior a un daño en el SNC por un TCE, como son procesos de neurogénesis, sinaptogénesis, plasticidad sináptica y reparación de la BHE (J. Kim et al., 2010; Madathil et al., 2013; Zhou et al., 2020).

Aunque controversial, se sabe que estas respuestas son completamente necesarias, como quedó demostrado en un estudio de un modelo de TCE moderado en ratones en los que la completa eliminación de astrocitos reactivos proliferativos dió como resultado una mayor inflamación y degeneración neuronal, confirmando el papel esencial de éstos en la preservación del tejido nervioso (Myer, 2006).

Microglía. Son las células fagocíticas mononucleares residentes del SNC y representan de un 5–20% del total de la población glial (Lawson et al., 1990). Su densidad varía dependiendo de las diferentes regiones cerebrales, por ejemplo, en el cuerpo calloso llega a ser un 5%, pero en la sustancia nigra llegan a tener una densidad de hasta el 12% (Lawson et al., 1990; Savchenko et al., 2000; Tremblay et al., 2011).

Aunque fue considerada por mucho tiempo como una célula con una actividad “estática” dentro de la fisiología normal del SNC, hoy se sabe que tiene un papel esencial en el desarrollo y madurez del cerebro a través de la denominada “poda sináptica” y de la producción de factores neurotróficos (Kierdorf & Prinz, 2017; Wu et al., 2015). Por otro lado, diversos trabajos han documentado que para mantener

la homeostasis del SNC, la microglía regula las sinapsis dependiendo de la actividad neuronal a través de la interacción simultánea con las neuronas y los astrocitos (Kettenmann et al., 2013; Tremblay et al., 2011). Finalmente, la microglía presenta una función altamente dinámica al sensor continuamente su microambiente mediante la expresión de una gran cantidad de receptores membranales (Nimmerjahn et al., 2005). Esto le permite detectar activamente cualquier DAMP proveniente principalmente de las neuronas, por lo que es la responsable de iniciar la respuesta inmune innata, por ejemplo, por enfermedades neurodegenerativas o por daños agudos directos, como el evento vascular cerebral (EVC) o el TCE (Brown & Neher, 2014; Butovsky et al., 2017; Wolf et al., 2017).

El análisis de la respuesta de la microglía en el TCE es extenso y complejo, pero puede resumirse en que toda vez que la microglía detecta un estímulo de daño, ésta responde sintetizando un amplio espectro de quimiocinas y citocinas pro y anti-inflamatorias, entre otros mediadores de la inflamación, así como mediante la expresión de una amplia gama de marcadores de superficie (**Figura 4**) (Franco & Fernández-Suárez, 2015).

De hecho, inicialmente para su estudio y dependiendo de la expresión de un cierto perfil de activación, la microglía se había dividido en el perfil M1 (activación clásica), principalmente pro-inflamatorio con producción de citocinas como interleucina (IL) 1 β (IL-1 β), IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), ERO, metaloproteinasas, óxido nítrico (ON), expresión de receptores de superficie como CD16, CD32 y en general se describía como un perfil que conducía al daño neuronal y a la disfunción cerebral (Jassam et al., 2017; Lyu et al., 2020). Por otro lado, el perfil M2 (activación alterna), se caracterizaba por eliminar los *debris* celulares a través de la fagocitosis, liberar factores neurotróficos y resolver la inflamación, por lo que se le describía como un perfil benéfico para la función cerebral (Lyu et al., 2020) y se subdividía en M2a, M2b y M2c con un papel principalmente anti-inflamatorio (Franco & Fernández-Suárez, 2015; Orihuela et al., 2016). Sin embargo, cabe resaltar que en la actualidad, esta clasificación M1/M2 se reconoce cada vez más como una

simplificación excesiva (Lyu et al., 2020) debido a que no refleja la verdadera diversidad de funciones de esta célula, sobretodo en enfermedades complejas como el TCE. De hecho, la microglía dentro del mismo tejido cerebral lesionado

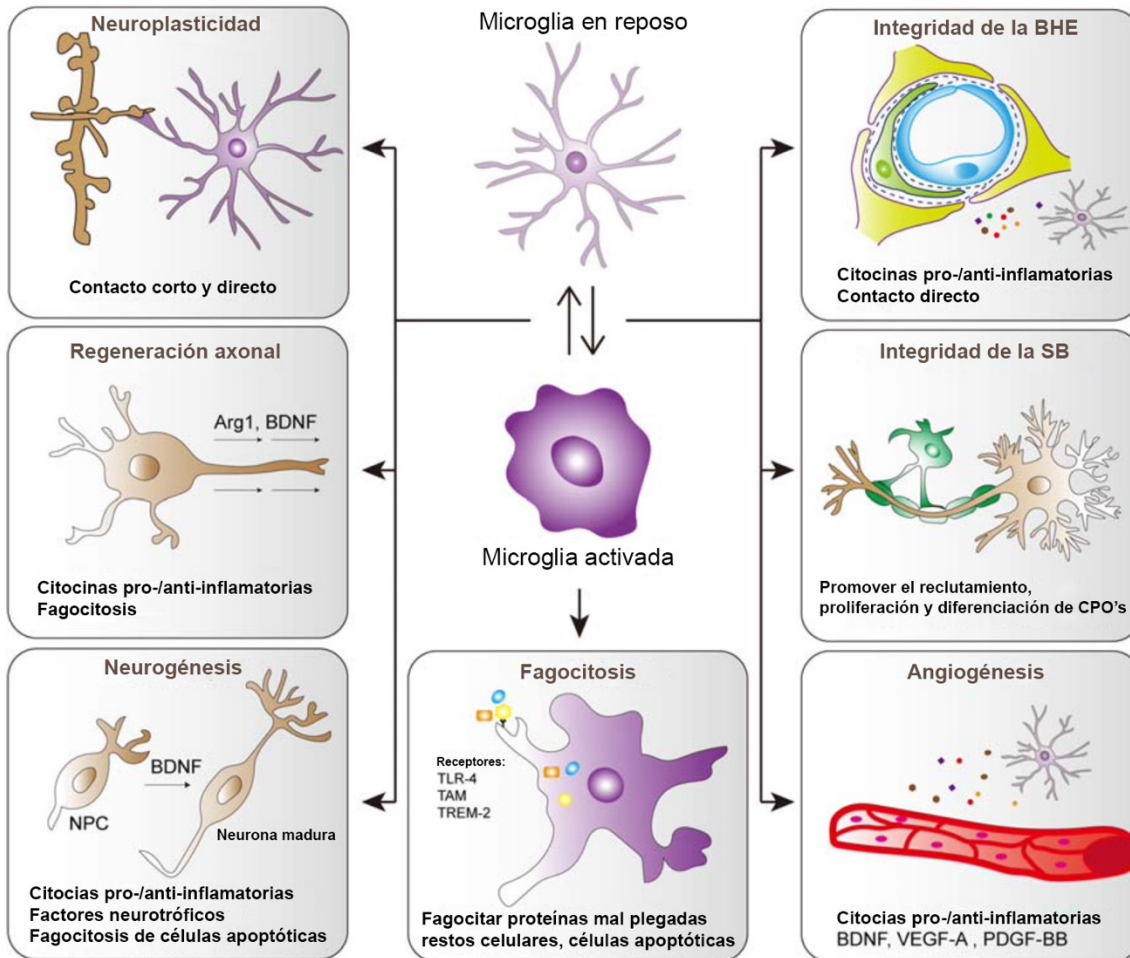


Figura 4. Funciones de la microglía después de una lesión cerebral. La microglía se activa rápidamente cuando el microambiente cambia después de una lesión cerebral y desempeña diversas funciones en la reparación del cerebro. Una vez activada, puede fagocitar proteínas mal plegadas y eliminar restos celulares y células apoptóticas mediante la activación de receptores de membrana específicos. La microglía anti-inflamatoria secreta citocinas/quimiocinas neuroprotectoras y factores neurotróficos que contribuyen a reparar la BHE, remielinizar, neurogénesis, angiogénesis y regeneración de axones. Además, los procesos microgliales hacen contacto directo con las sinapsis neuronales y pueden modular rápidamente la neuroplasticidad y la función neuronal. Abreviaciones: Arg1, arginasa 1; BDNF, factor neurotrófico derivado de cerebro; NPC, células precursoras neuronales; TLR, receptores tipo toll; TREM, receptor expresado en células mieloides; TAM, Tyro3, Axl y Mer; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; PDGF-BB, factor de crecimiento derivado de plaquetas. Tomado, modificado y traducido de Lyu et al., 2020.

puede existir en diferentes estados funcionales definidos por la expresión de adherencia, maduración, efectores y moléculas quimioatrayentes, entre otros (Jassam et al., 2017; Ransohoff, 2016).

Toda vez que el cerebro sufre una lesión, la microglía realiza una rápida activación y un cambio fenotípico característico, ejerciendo una función, al igual que el astrocito, como “arma de doble filo” en el daño cerebral y los procesos de reparación (Simon et al., 2017). Las diferencias de edad y sexo influyen significativamente en la función de la microglía tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, y una variedad de moduladores tienen la capacidad de regular la polarización del fenotipo de la microglía.

Dentro de estos cambios fenotípicos, una de las características más destacables de la microglía en comparación con los macrófagos residentes de otros órganos, es su morfología. Históricamente, era descrita como una célula “ramificada” con soma pequeño y presencia de finos procesos celulares o ramificaciones. Esta típica apariencia se había asociado a un estado de *reposo*. Por otro lado, procesos patológicos como infección, trauma, isquemia, enfermedades neurodegenerativas, o alteración de la actividad neuronal, es decir cualquier perturbación o pérdida de la homeostasis cerebral que indica un peligro real o potencial para el SNC, puede provocar cambios rápidos y profundos en la forma celular microglial, expresión génica y en el comportamiento funcional que se define habitualmente como microglía *activada*; fenotípicamente la complejidad de los procesos celulares se reduce y la microglía adquiere una apariencia descrita generalmente como “ameboide” (Kettenmann et al., 2011).

2.4 Neuroprotección

La complejidad de la fisiopatología del TCE ha generado que sea muy difícil encontrar un tratamiento único y específico, sin embargo, todos los esfuerzos terapéuticos están enfocados a la preservación del tejido nervioso después del trauma. A esto se le ha denominado como “neuroprotección” la cual podemos definir

como “el empleo de cualquier modalidad terapéutica que previene, retarda, recupera y posiblemente regenere el sistema nervioso, sus células, su estructura y su función” (Vajda, 2002; Estrada-Rojo et al., 2012). De acuerdo con esta definición podríamos considerar que tanto el uso de fármacos, como el empleo de estrategias terapéuticas aplicadas (exógenas) a un paciente con TCE serían un tipo de neuroprotección; de hecho está bien establecido experimentalmente que una variedad de manipulaciones no farmacológicas pueden proporcionar neuroprotección, como el ejercicio, la restricción calórica y ciertos tipos de actividad mental o enriquecimiento ambiental (Faden & Stoica, 2007).

Diversos autores han considerado que al mismo tiempo que se generan estos mecanismos de daño, el propio organismo activa procesos que intentan mantener la integridad y funcionalidad del cerebro, y se ha propuesto que diversos estímulos no farmacológicos, como el ejercicio (Chin et al., 2015) o la restricción calórica (Y. Liu et al., 2017) funcionan como estresores ambientales que activan factores neuroprotectores dentro del organismo (como el BDNF o proteínas de *shock* térmico) (Faden & Stoica, 2007) y por lo tanto estos procesos también pueden ser considerados como mecanismos de neuroprotección “endógenos” (Dirnagl et al., 2003; Jain, 2019; Leker & Shohami, 2002).

2.5 Neuroprotección endógena

Podríamos definir a este tipo de neuroprotección como la serie de mecanismos celulares y moleculares que se activan de forma endógena posterior a una lesión del tejido nervioso como el TCE y que tienen como finalidad contrarrestar los eventos nocivos que conducen a la muerte neuronal (Rodríguez et al., 2021).

Dentro de esta serie de mecanismos, las células que tienen un papel esencial en la activación de estos procesos de neuroprotección son los astrocitos y la microglía, al ser los encargados de activar procesos que intentan contrarrestar las vías fisiopatológicas como el daño por excitotoxicidad. Por ejemplo, los astrocitos al intentar recapturar el exceso de glutamato (Karve et al., 2016) o la microglía al

sintetizar citocinas y quimiocinas anti-inflamatorias ante el aumento en el microambiente de estimulación pro-inflamatoria (Loane & Kumar, 2016). De manera interesante, en nuestro laboratorio, hemos encontrado que la neuroprotección endógena en la respuesta al TCE presenta una variación diurna (Morales-Gomez, 2013; Estrada-Rojo et al., 2018).

3. VARIACIÓN DIURNA

3.1 Ritmos biológicos y variación diurna

Los ritmos biológicos son propiedades esenciales de casi todos los organismos, desde las bacterias y hongos, hasta las plantas y los animales (Bhadra et al., 2017). Estos ritmos son considerados como el resultado de la presión evolutiva y la selección natural que permite a los organismos predecir, preparar y adaptarse a los cambios ambientales a través de sincronizadores (conocidos como *zeitgebers*), que son percibidos por el organismo y que posteriormente generan una respuesta fisiológica a través de la alteración de los niveles hormonales, la temperatura corporal, el metabolismo e inclusive modificación de procesos cognitivos.

En este sentido los *zeitgebers* pueden ser la ingesta de comida (Sahar & Sassone-Corsi, 2012), cambios en la temperatura ambiental (Refinetti, 2015) o en la actividad física (Lewis et al., 2018); sin embargo, el más importante y mejor estudiado es el ciclo luz–oscuridad, el cuál es detectado por una serie de estructuras jerárquicamente organizadas en el hipotálamo y que son las responsables de generar el ritmo circadiano en el organismo (Terzibasi-Tozzini et al., 2017), es decir, es generado por un oscilador circadiano endógeno (~24 h).

Por otro lado, la variación diurna o ritmo diurno es descriptivo; se refiere a un patrón observado con una duración de 24 horas. Este patrón puede ser causado por un marcapasos circadiano endógeno y/o por otros eventos dentro del día de 24 h, como patrones de sueño–vigilia, actividad, comidas, contactos sociales, cambios posturales o exposición a la luz (Klerman, 2005).

3.2 Variación diurna de las enfermedades

Algunos estudios han demostrado que la variación diurna normal puede contribuir al desarrollo de la fisiopatología de una enfermedad y por lo tanto a su presentación clínica. Por ejemplo, mientras que un infarto agudo al miocardio puede ser ocasionado por la pérdida del flujo sanguíneo a una porción específica del músculo estriado cardíaco, la variación diurna en factores que determinan el flujo sanguíneo o la coagulación podrían modular la hora del día en que ocurre un infarto (Čulić, 2014; Scheer & Shea, 2014).

Algunos estudios con datos epidemiológicos han demostrado que los eventos relacionados con enfermedades cardiovasculares, como arritmias (Hayter et al., 2021), el infarto agudo al miocardio (IAM), muerte cardíaca súbita y EVC (Raj et al., 2015; Thosar et al., 2018) son más comunes de presentarse durante la mañana.

3.3 Variación diurna del daño secundario

Relacionado al inicio de la presentación de un evento patológico, se puede mencionar que también la magnitud del daño que éste pueda ocasionar va a presentar una variación diurna. Por ejemplo, un estudio en ratas demostró que la magnitud del daño inducido por una lesión isquémica, medida a través del volumen total del cerebro infartado, fue tres veces mayor en ratas con lesión durante la noche en comparación con ratas lesionadas durante el día (Vinall et al., 2000). Contrario a esto, otro estudio pero realizado en ratones, demostró que la susceptibilidad a un EVC isquémico, medido a través del volumen del infarto, grado de edema cerebral, puntaje neurológico y supervivencia neuronal mayor fue encontrado en ratones con el EVC inducido durante la noche (Beker et al., 2018).

En relación al daño secundario ocasionado por un TCE, se ha encontrado que algunas vías fisiopatológicas presentan un patrón de variación circadiana. Por ejemplo, en nuestro laboratorio hemos reportado que la expresión del receptor de NMDA que juega un papel esencial en el daño por excitotoxicidad, varía a lo largo

del día en corteza cerebral de rata, tanto en grupos controles como en aquellos a los que se les indujo un TCE, siendo esta expresión menor durante las horas de oscuridad y mayor en las horas de luz. Esto correlaciona directamente con la gravedad del daño posterior al TCE (Estrada-Rojo et al., 2018).

En otro estudio, también, encontramos variaciones diurnas en la expresión del receptor a cannabinoides CB1 en corteza cerebral de rata; sin embargo, ésta no parece correlacionarse con el daño ocasionado por un TCE (Martinez-Vargas et al., 2013; Morales-Gomez, 2013). Por otro lado, diversos trabajos han revisado y resaltado las variaciones que el sistema redox del organismo presenta a lo largo del día (O'Neill & Feeney, 2014; Wilking et al., 2013) y la importancia del estrés oxidativo posterior a un TCE (Hiebert et al., 2015).

Finalmente, la inflamación es un proceso que se ha descrito como fuertemente influenciado por señales diurnas, tanto en condiciones fisiológicas, como en respuesta a desafíos inflamatorios. Es probable que su regulación esté optimizada para proporcionar protección en momentos específicos dependiendo de la hora del día (Scheiermann et al., 2018). Particularmente en el SNC, un estudio reciente demostró que la microglía aislada de hipocampo de rata durante la fase de luz, presentó una mayor transcripción de citocinas pro-inflamatorias en comparación con la que fue aislada durante la fase nocturna. También encontraron que la respuesta inflamatoria posterior a la aplicación periférica de lipopolisacárido se relacionó directamente con esta variación diurna (Fonken et al., 2015).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Experimentos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio en ratas sometidas a un modelo de TCE en diferentes horas del día, mostraron un mejor desempeño en una sola prueba conductual de los sujetos experimentales traumatizados durante la noche en comparación con los traumatizados durante el día.

Este mejor desempeño cuando el TCE se induce durante la fase nocturna del ciclo luz–oscuridad, pudiera relacionarse con una mejor preservación del tejido nervioso en la zona perilesional al trauma y en una menor extensión del daño secundario. Esto también puede asociarse a la variación diurna de la respuesta inmune que ya ha sido descrita en otros órganos, pero aún falta información en el SNC. Por esto, las células de la microglía y los astrocitos pudieran jugar un papel esencial en la diferencia en esta respuesta al trauma.

Hasta el momento no existe evidencia de que la variación diurna pudiera ejercer una diferencia en la activación de la respuesta inmune en SNC, lo que a su vez pudiera asociarse a una menor extensión del daño secundario y esto asociarse con una mayor neuroprotección posterior a un TCE durante la fase nocturna del ciclo luz – oscuridad.

5. HIPÓTESIS

Si la relación daño/neuroprotección posterior a un TCE presenta variaciones diurnas, con una tendencia a la neuroprotección durante la fase de oscuridad, entonces las ratas sometidas a un modelo de TCE durante la fase de oscuridad presentarán un mejor desempeño en pruebas conductuales motoras, una mejor preservación histopatológica y una menor activación de la microglía en SNC que durante la fase de luz.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la variación diurna en la respuesta conductual motora al TCE se asocia a una mayor neuroprotección durante la fase de oscuridad, describiendo y analizando el daño celular mediante histopatología de corteza cerebral e hipocampo, y mediante la descripción de la respuesta morfológica de la microglía.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En ratas sometidas a un modelo de TCE en dos diferentes horas del ciclo luz oscuridad [Día = 13 h; Noche = 01 h], a las 24 y 72 h posteriores al trauma:

1. Evaluar la respuesta conductual motora a través de la aplicación de diferentes pruebas neuroconductuales.
2. Describir y analizar el daño morfológico en la zona perilesional al daño primario del TCE (corteza motora) y en la zona de daño secundario (hipocampo) en el lado ipsilateral al trauma.
3. Describir y analizar la respuesta morfológica de la microglía y de los astrocitos en la zona perilesional al daño primario del TCE (corteza motora) y en la zona de daño secundario (hipocampo) en el lado ipsilateral al trauma.
4. Cuantificación de citocinas proinflamatorias en la zona de daño secundario (hipocampo), del lado ipsilateral al trauma.
5. Asociar los hallazgos morfológicos e histopatológicos en corteza motora e hipocampo, con las pruebas conductuales y la cuantificación de citocinas proinflamatorias.

7. METODOLOGÍA

7.1 Sujetos experimentales

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho Wistar de 250-300 g provenientes de la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los sujetos experimentales fueron alojados en cajas individuales con alimento y agua *ad libitum* a una temperatura ambiente de 21 ± 2 °C. Se les dio por lo menos 15 días de ambientación a las condiciones del bioterio antes de comenzar los experimentos. Todas las ratas se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 con luces encendidas a las 08:00 o a las 20:00 h. Las mediciones de los parámetros generales de salud (ingesta de comida y peso corporal) se realizaron diariamente a la misma hora (12:00 h) antes y después del TCE. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las recomendaciones del Comité de Ética y del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la UNAM (proyecto: 018/2016; aprobado el 05 de abril del 2016, con adenda el 09 de junio de 2020) y de acuerdo a las regulaciones establecidas por la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) para las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

7.2 Diseño experimental

Los sujetos experimentales fueron divididos en dos grupos, al que le denominamos “de Día” y el grupo denominado “de Noche”. Los experimentos en el grupo de Día fueron realizados durante las horas de luz y el TCE fue inducido a las 13:00 h (5 h después de encender las luces); los experimentos en el grupo de Noche fueron realizados durante las horas de oscuridad y el TCE fue inducido a las 01:00 h (5 h después de apagar las luces). Cabe destacar que en el grupo de Noche, tanto el TCE como las pruebas conductuales fueron realizados en un cuarto oscuro con luz roja menor a 10 lx para evitar alteraciones en el ciclo sueño – vigilia (Zhang et al. 2016). Para las pruebas conductuales, las ratas fueron estudiadas 24 y 72 h posteriores a la inducción del trauma. En ambos grupos de Día y de Noche, las ratas

fueron subdivididas en subgrupos Sham (n=10) y TCE (n=10). El subgrupo Sham fue diseñado para sólo recibir anestesia (**Figura 5**).

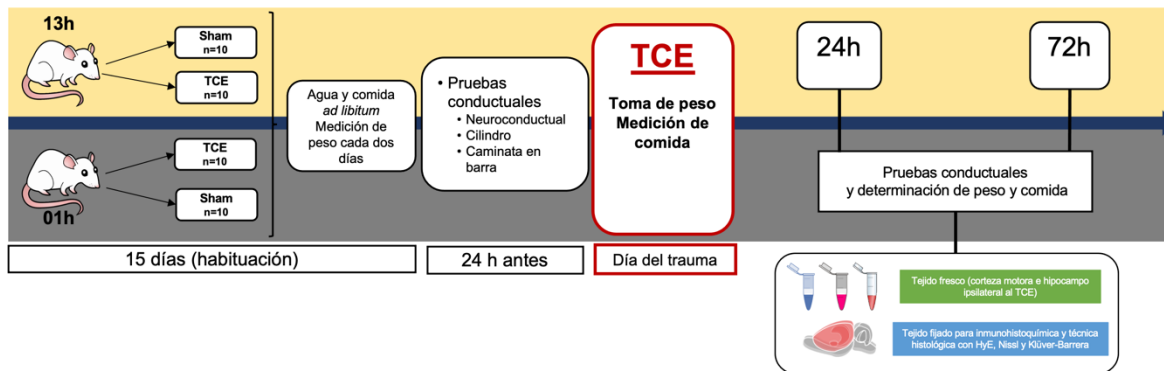


Figura 5. Diagrama del diseño experimental empleado.

7.3 Modelo de TCE

Los animales fueron sometidos a un TCE, utilizando un modelo tipo “*Closed Head Injury*” reportado previamente por nuestro laboratorio (**Figura 6**) (Estrada-Royo et al., 2018; Martínez-Vargas et al., 2012, 2014). Primeramente las ratas se anestesiaron dentro de una cámara de acrílico (diseñada *ex profeso*) para anestesia con gas (25 cm × 11 cm × 10 cm). La concentración de isoflurano (Sofloran®Vet, PiSA Agropecuaria, Hgo., México) durante el periodo de inducción fueron de 4.0% suplementado con O₂. A la pérdida del reflejo de enderezamiento y una disminución de la frecuencia respiratoria menor a 50 por minuto, las ratas fueron retiradas de la cámara y se les colocó un cono nasal conectado al mismo suministro de isoflurano adaptado a un aparato estereotáxico. La concentración de isoflurano fue reducida a 3.0% para mantener la profundidad anestésica de tolerancia quirúrgica. Después, las cabezas de las ratas fueron desinfectadas con clorexidina y se realizó una incisión en la línea media para exposición del cráneo. Posteriormente, se localizó el área del trauma con el estereotáxico (**Figura 6 E y F**) en las coordenadas P = - 2 y L = 1.4 (corteza motora primaria [M1], de acuerdo con el “Atlas de Paxinos y Watson para coordenadas estereotáxicas en cerebro de rata”). Finalmente, la rata se trasladó al “aparato inductor de trauma” con las mismas condiciones de anestesia. El TCE se indujo mediante un sistema construido en acero inoxidable y con diseño sanitario que se opera como un estereotáxico, lo que permite fijar el punto de

contacto con el cráneo de manera precisa (**Figura 6G**). El contacto se hace por medio de un pistón neumático, el cual se encuentra conectado a un manómetro y un compresor que controlan la fuerza con la que el pistón impacta el cráneo (40 libras/(pulgada)² de presión y 6 mm de profundidad). Después de la inducción del TCE, se retiró el suministro de isoflurano y la rata fue colocada en reclinación dorsal en su caja y regresada al bioterio una vez recuperado el reflejo de enderezamiento.

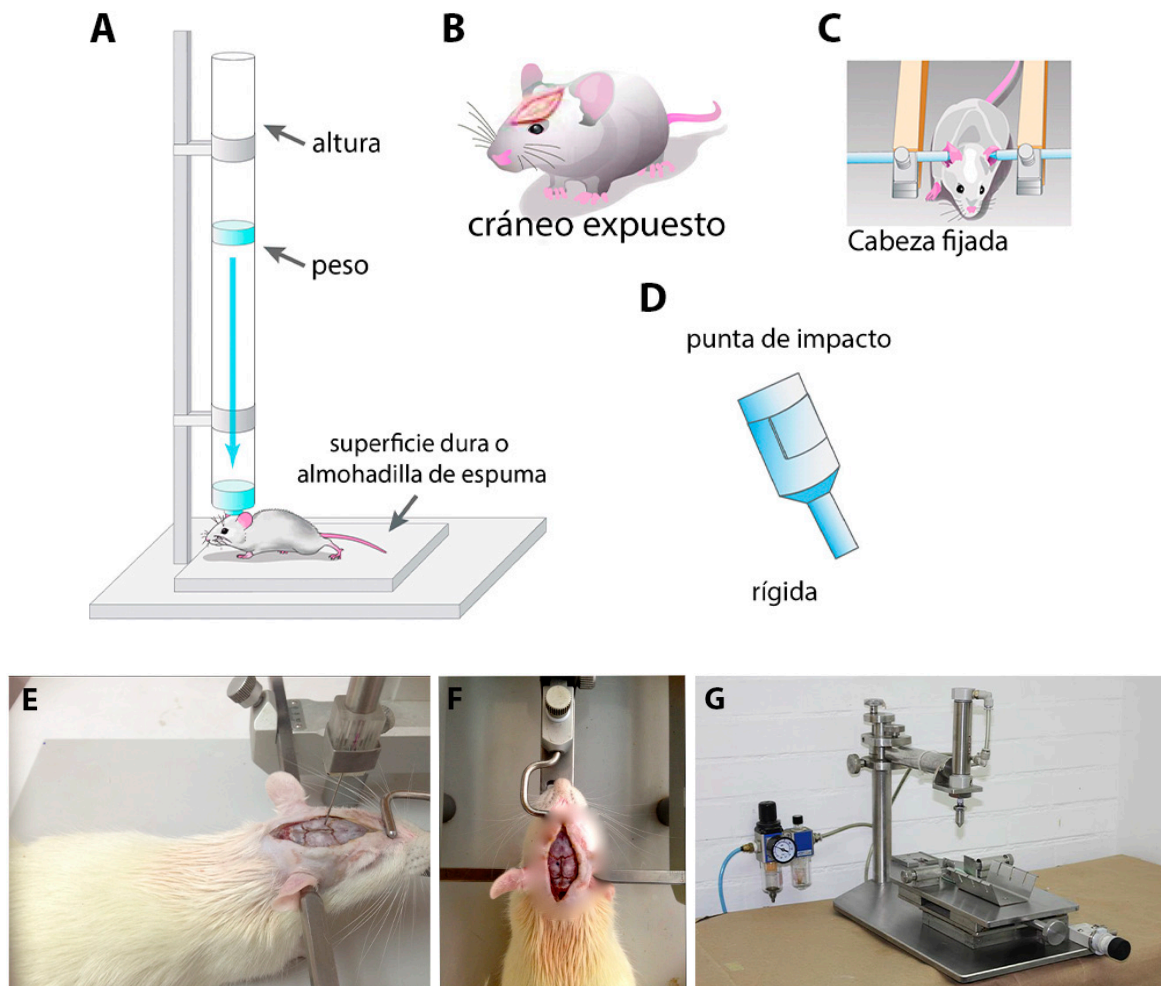


Figura 6. Modelo de TCE utilizado en el laboratorio. El modelo de caída de peso induce un TCE en un sólo lado del cráneo expuesto. Este modelo se asocia principalmente con una lesión difusa. (A) Características descritas para la inducción del TCE: exposición de cráneo (B), fijación de la cabeza (C) y punta roma y rígida de impacto (D). Fotografías representativas de los sujetos experimentales posicionados en el aparato estereotáxico (E), localización del sitio del TCE (F) e imagen de nuestro dispositivo inductor del trauma (G). Figuras A – D tomadas, traducidas y modificadas de Bodnar et al., 2019. Fotografías D – G, Laboratorio de Neuroendocrinología, cortesía de Alejandro Hernández.

7.4 Evaluación de la conducta motora

Con el propósito de evaluar nuestro primer objetivo particular y evaluar las repercusiones del TCE en la conducta motora dependiendo de la hora en que se indujera el trauma, utilizamos tres pruebas conductuales: una escala neuroconductual, la prueba de cilindro y la prueba de caminata en barra.

7.4.1 Escala neuroconductual

El déficit motor posterior al TCE fue medido utilizando una escala neurológica y de comportamiento de 21-puntos previamente descrita (Hunter et al., 2000). Su aplicación se realizó 24 h previas al TCE con el fin de obtener el puntaje basal, y 24 o 72 h posteriores al trauma una hora antes de su eutanasia. La prueba evalúa los siguientes parámetros, colocación de patas (4 puntos), reflejos correctos (1), equilibrio en barra horizontal (3), plataforma inclinada (3), rotación (2), alcanzamiento visual de patas delanteras (2), reflejo contralateral (2), motilidad (2) y condiciones generales (2). El máximo puntaje en ratas sanas está estandarizado en 21 pts., y la descripción para el puntaje de cada parámetro se encuentra en la **Tabla 2**. Aunque esta escala fue estandarizada inicialmente para evaluar el efecto de un modelo de isquemia cerebral, se ha reportado que vías fisiopatológicas similares están presentes en ambas formas de daño cerebral (Leker & Shohami, 2002). Además, en trabajos previos de nuestro laboratorio hemos utilizado esta escala para la valoración del daño neurológico después del TCE (Estrada-Rojó et al., 2018; Martínez-Vargas et al., 2012, 2014).

Tabla 2. Descripción de los parámetros de la escala neuroconductual de 21 pts.	
Parámetro	Puntaje máximo
1. Colocación de la pata El animal se coloca sobre el borde de un banco, cada pata la coloca cruzada sobre dicho borde del banco. Se jala una de las extremidades y cada que coloca correctamente la pata sobre el borde es 1 punto. 1 pto. - Por cada pata	4
2. Reflejos correctos	1

El animal se coloca en posición supina sobre la palma de la mano, si el animal regresa espontáneamente a su posición correcta se le da 1 punto.	
3. Prueba de la barra horizontal Las patas delanteras del animal se colocan sobre una barra, se espera que el animal se suba a la barra o se cuelgue por 3 segundos: 3 pts. – Si sube ambas extremidades posteriores a la barra 2 pts. – Si sube una sola extremidad posterior a la barra 1 pto. – Si el animal solo se cuelga (mínimo 3 segundos) 0 pts. – Si el animal se cae	3
4. Plataforma inclinada Se coloca al animal con la cabeza hacia abajo sobre una plataforma inclinada 45°: 3 pts. – Si el animal se rota máximo en 15 seg. 2 pts. – Si le toma rotarse entre 15 y 30 seg. 1 pto. – Si le toma rotarse más de 30 seg. 0 pts. – Si el animal se cae o permanece con la cabeza hacia abajo	3
5. Rotación El animal se sostiene de la base de la cola y rota en dirección de las manecillas del reloj, cuando se gira en sentido contrario el animal debe rotar contralateralmente a la dirección que se le rotó 1 pto. – Por cada lado que rote al contrario	2
6. Alcanzamiento visual de las patas delanteras Capacidad del animal para alcanzar un borde con las patas delanteras cuando se sostiene ligeramente del torso o de la cola 1 pto. – Por cada colocación exitosa de las patas delanteras sobre el borde	2
7. Circulación 1 pto. – No gira en círculos 0 pts. – Gira en círculos	1
8. Reflejo contralateral 1 pto. – Sin reflejo 0 pts. – Con reflejo	1
9. Motilidad 2 pts. – Motilidad normal 1 pto. – Balanceo y no fijo 0 pts. – Inmovil	2
10. Condiciones generales 2 pts. – Normal (buena condición de pelaje, alerta) 1 pto. – Desaliñado (pelaje sucio, postura encorvada y agresivo) 0 pts. – Delgado, débil y poco tono muscular	2

7.4.2 Prueba de cilindro

La recuperación funcional generalmente se evalúa con pruebas de comportamiento que miden los déficits funcionales; en este caso, medimos las habilidades motoras asociadas con el daño a regiones cerebrales específicas. Varias pruebas de control motor demuestran la presencia de daño cerebral, ya sea debido a trauma o isquemia, en el área sensori-motora de la corteza. La prueba de cilindro es ampliamente utilizada en ratas y permite la evaluación de los déficits funcionales en la actividad de las extremidades anteriores (Livingston-Thomas & Tasker, 2013; Magno et al., 2019; Roome & Vanderluit, 2015). Para medir la actividad motora espontánea y la asimetría de las extremidades después del TCE, utilizamos esta prueba de cilindro como se describió anteriormente (Rodgers et al., 2014). La evaluación se realizó 24 h antes del TCE para obtener la puntuación basal, y 24 h

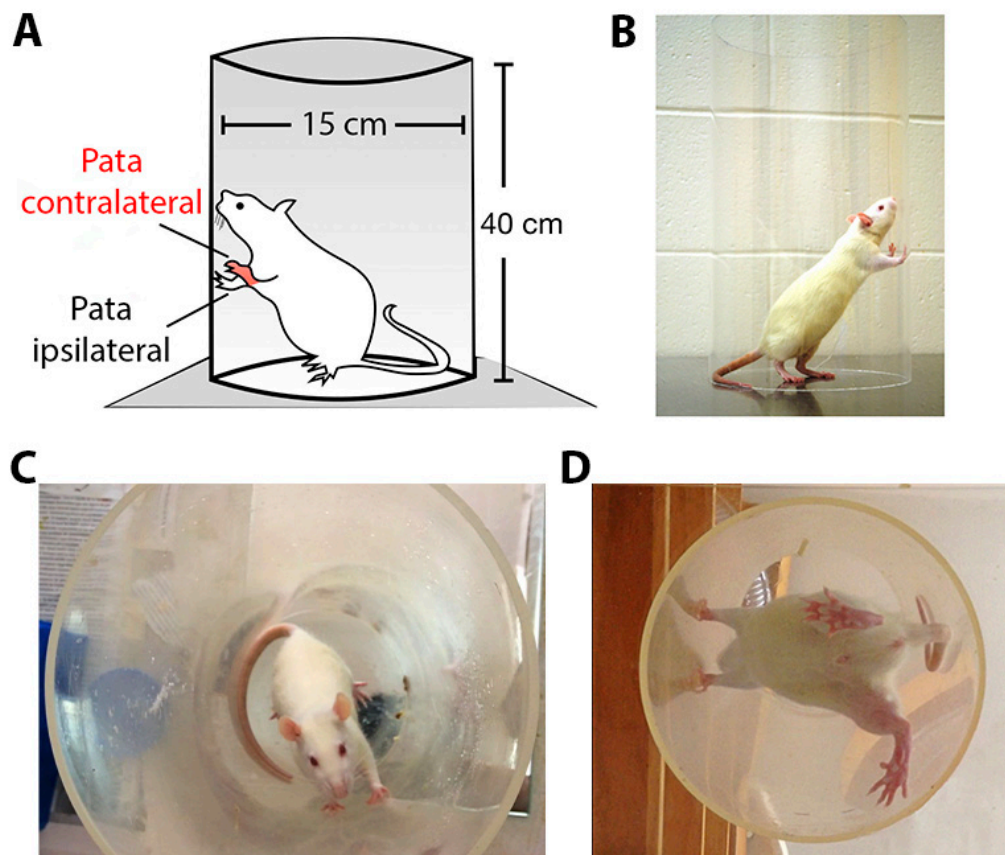


Figura 7. Prueba de cilindro. Esquema de la prueba de cilindro en la cuál se utiliza un cilindro de acrílico de 15 cm de diámetro × 40 cm de alto (A). Fotografías de la prueba en rata Wistar (B–D). Imagen A tomada, modificada y traducida de Magno et al., 2019; imagen B, tomada de Livingston-Thomas & Tasker, 2013.

o 72 h después del trauma, una hora antes de la eutanasia. Se utilizó un cilindro de acrílico de 15 cm de diámetro y una altura de 40 cm. Las ratas se colocaron dentro del cilindro y se registró durante 2 minutos el número de veces que la rata colocó la pata izquierda, la pata derecha, o ambas, en la pared del cilindro (**Figura 7**).

7.4.3 Prueba de caminata en barra

Con el propósito de evaluar el déficit en la coordinación y principalmente en la actividad motora fina en las ratas del grupo de Día y de Noche y sus respectivos subgrupos, Sham y TCE se les aplicó la prueba de caminata en barra. Esta prueba la realizamos mediante técnicas adaptadas de trabajos publicados previamente (Chen et al., 2017; Hausser et al., 2018; Piot-Grosjean et al., 2001), a continuación realizamos una breve descripción. Se utilizó una barra de madera cuadrada de 100 × 2 cm elevada a 40 cm del piso de la mesa mediante soportes también de madera. En un extremo se ubicó una “caja negra de meta” o caja de escape de 12 × 15 × 26 cm, con una abertura de entrada de 7 × 9 cm (**Figura 8**). Las ratas se colocaron en el extremo libre y se entrenaron para atravesar la barra y entrar en el extremo con la caja de escape durante 4 días seguidos previos a la lesión. Al finalizar el entrenamiento se tomó como basal la medición de 24 h antes del TCE y se realizaron tres mediciones 1 h previa a la eutanización a las 24 h y 72 h después

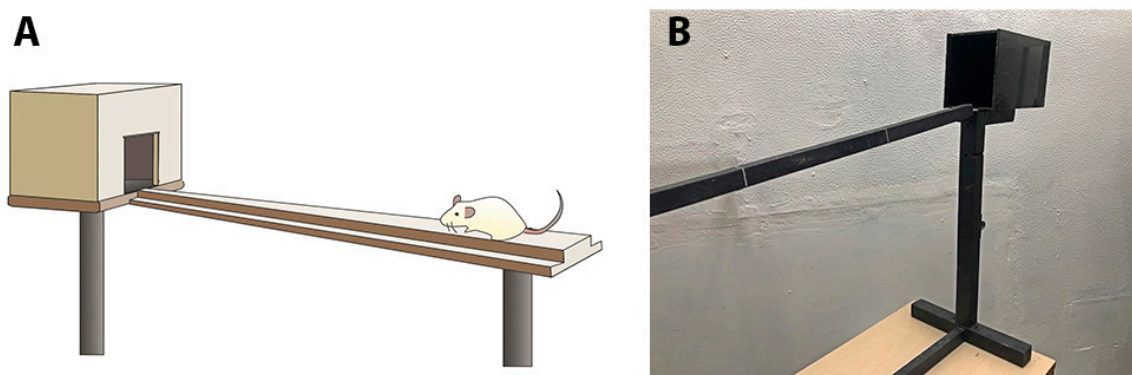


Figura 8. Prueba de caminata en barra. Esquema de la prueba de barra en la cual se coloca a la rata en el extremo libre y se le entrena para que llegue hasta la caja de escape (**A**). Fotografía de la prueba de barra en el extremo con la caja de escape y que fue usada en nuestro laboratorio (**B**). Imagen **A** tomada y modificada de Hausser et al., 2018.

del trauma. En estas mediciones, el observador registró el tiempo que le tomó al animal cruzar con las patas delanteras la caja negra de escape y la cantidad de errores cometidos (como exceder el tiempo máximo de la prueba [60 s], o caerse de la barra). La rata se colocó en la barra por tres intentos y se utilizaron las puntuaciones medias diarias para el análisis estadístico.

7.5 Evaluación histopatológica y morfológica

Con el fin de cubrir nuestro segundo objetivo y determinar el daño tisular y evaluar la morfología de las células en respuesta al TCE, el cerebro de las ratas se procesó mediante fijación, se obtuvieron cortes a los que se les realizaron tres diferentes tinciones en donde se evaluó el grado de daño a partir de una clasificación del daño neuronal (**Tabla 3**). Por otro lado, considerando que la función de la microglía y su función inmune están fuertemente ligados, consideramos que una mayor ramificación y una mayor extensión se relacionan con una menor activación, por lo que una menor ramificación y una menor extensión sin indicativos de una mayor activación (Fernández-Arjona et al., 2017).

7.5.1 Procesamiento del tejido y tinciones

Los animales de los grupos de Día y de Noche (n = 4) fueron sometidos a eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico (Pisabental[®], 50 mg/kg *i.p.*, PiSA Agropecuaria, Hgo., México) 24 h o 72 h después de la inducción del TCE y perfundidos vía cardiaca con buffer de fosfato de sodio y posteriormente con paraformaldehído al 4% (Gage et al., 2012). Los cerebros fueron removidos previa disección de cráneo y meninges e inmediatamente postfijados por al menos 24 h. Después, los cerebros fueron enjuagados con agua, deshidratados por inmersión en grados ascendentes de alcohol, aclarados en xilol y montados en parafina con orientación adecuada para la obtención de tres series de cortes sagitales de 4- μ m de grosor de la línea media hacia el lado izquierdo del cerebro (zona del TCE). Las muestras histológicas fueron teñidas con las técnicas de hematoxilina y eosina (HyE), Klüver–Barrera y Nissl (violeta de cresilo) para el análisis de cambios

histopatológicos generales del tejido, mielina y valorar la morfología neuronal, respectivamente.

7.5.2 Inmunohistoquímica

Las muestras histológicas de los subgrupos Sham y TCE tanto del grupo de Día como de Noche fueron procesadas y analizadas a las 24 y 72 h después del TCE para observar astrocitos mediante GFAP+ y microglía con Iba-1+. Los cortes en blanco fueron procesados como a continuación se describe: una vez rehidratados, los cortes fueron sumergidos en un vaso de Coplin con buffer de citrato de sodio pH 7.4, para hacer la recuperación antigénica dentro de una olla de presión eléctrica calentada a 120 °C y en horno de microondas. Después de 5 min, la presión fue liberada, fue extraído el vaso de Coplin y después de llegar a la temperatura ambiente (TA) los cortes fueron lavados con agua destilada (AD).

El bloqueo de la peroxidasa endógena se obtuvo sumergiendo los cortes en una solución de 5 mL de H₂O₂ al 3% en 20 mL de AD durante 20 min a TA. Después de lavarlos con AD durante un min, los cortes fueron tratados con leche en polvo deslactosada al 4% diluida en Tris-HCl con Tritón X-100 al 0.01% a 37°C durante 1 h para el bloqueo de proteínas inespecíficas. Inmediatamente después, se escurrió la solución de bloqueo y sin lavado previo, los cortes fueron incubados durante 40 min a TA con un anticuerpo policlonal anti-GFAP (1:100; CM065C, Biocare Medical) y anti-Iba1 (1:100; CP290A, Biocare Medical) en Tris-HCl /ASB al 0.1%. Luego de tres lavados con Tris-HCl 1x durante 4 min.

Posteriormente los cortes fueron cubiertos con un anticuerpo secundario (Goat anti-rabbit IgG) acoplado a peroxidasa de rábano, diluido 1:100 en Tris-HCl con ASB al 0.1% y Tritón X-100 al 0.01%, durante 15 min a TA. Luego de 5 lavados con Tris-HCl, el revelado de la unión del anticuerpo secundario se realizó con la mezcla de 5 mg de 3,3-Diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich®) en 10 mL de Tris-HCl con 3 gotas de H₂O₂ al 3% (3 gotas de H₂O₂ puro en 7 gotas de AD), aplicada sobre los cortes durante 3 min, a TA. La reacción enzimática cromógena se controló mediante

observación directa al microscópio y se detuvo con lavados en AD. Finalmente, se realizó la contratinción con Hematoxilina de Harris durante 15 s, se viró con Li_2CO_3 (carbonato de litio) al 5% por 10 baños se realizó deshidratación y las preparaciones se montaron con resina sintética.

7.5.3 Adquisición de imágenes

Los cambios histopatológicos fueron analizados en cuatro diferentes regiones cerebrales – tres áreas del hipocampo (CA1, CA2/3 y giro dentado [GD]) y la corteza cerebral perilesional (Cx), un área adyacente al sitio del trauma determinada con un campo de separación de 40× (121.83 μm) a la zona de daño primario. Obtuvimos un total de 50 campos con el objetivo de 40× con un área previamente calculada por campo de 19,700 μm^2 . Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio CX31 Olympus equipado con una cámara digital y analizadas con el software Infinity Analyze® v 6.3.0.

7.5.4 Descripción y análisis histopatológico

Histopatología general. Se realizó el conteo celular para determinar el daño en todos los campos de la Cx perilesional al trauma en el tejido teñido con HyE. El análisis de las imágenes se enfocó en determinar la presencia de neuronas normales (NN), neuronas con cambios (NC) y neuronas en degeneración (ND) con los criterios establecidos en la **Tabla 3**. También, los cambios en la reactividad astrocitaria fueron considerados, basados en el tamaño celular, en el núcleo y el aspecto de la cromatina (Garman, 2011).

Por otro lado, la vasculatura fue observada directamente y se comparó el tamaño del lumen vascular de los grupos con TCE con el del subgrupo Sham. Se calculó un promedio de los conteos realizados por tres diferentes observadores experimentados cegados. Para las tres subregiones de hipocampo (CA1, CA2/CA3 y GD) se calculó el porcentaje de ND respecto al número total de neuronas por campo para observar la respuesta del tejido al daño secundario. Finalmente, el conteo en cada una de las subregiones fue promediado.

Tabla 3. Criterios para el conteo celular basados en la morfología neuronal.

NN	NC	ND*
<ul style="list-style-type: none"> Núcleo grande con cromatina abierta y un nucleolo prominente Cuerpos celulares con abundante citoplasma, sustancia Nissl variable (retículo endoplásmico rugoso) Forma y tamaño del cuerpo celular sin cambios 	<ul style="list-style-type: none"> Núcleo colapsado, oscuro y nucleolo mal definido Disminución del tamaño neuronal (encogido o contraído) Cuerpos de inclusión basófilos en el pericarion El citoplasma aparece condensado y se tiñe de forma oscura (neuronas oscuras) 	<ul style="list-style-type: none"> Contracción del cuerpo celular Pérdida de sustancia Nissl. Núcleo pequeño / encogido, teñido oscuro (picnótico) que podría sufrir fragmentación (cariorrhexis) Ruptura de la membrana celular Intensa tinción eosinofílica del citoplasma

*Se consideró este nombre y estas características neuromorfológicas con base en un trabajo previamente publicado, en el que se relaciona la aparición de características eosinofílicas con degeneración neuronal (Garman, 2011).

Sustancia blanca. Con el fin de determinar la integridad de la sustancia blanca (SB), en los cortes histológicos teñidos con la técnica de Klüver–Barrera, evaluamos en las regiones del cuerpo calloso (CC) y giro del cíngulo (GC) en fotomicrografías a 40×, utilizando una escala de cuatro puntos previamente descrita: normal (grado 0), desorden de las fibras nerviosas (grado 1), formación de vacuolas (grado 2), y desaparición de las fibras mielinizadas (grado 3) (Q. Liu et al., 2013; Miyamoto et al., 2004; Wakita et al., 1999). Se asignaron puntuaciones numéricas a cada fotomicrografía y se promediaron los valores y finalmente se calcularon las puntuaciones medias para cada ratón.

7.5.5 Análisis de inmunohistoquímica

Se realizó un análisis de las fotomicrografías de las muestras de cerebro marcadas mediante inmunohistoquímica con los anticuerpos Iba-1+ y GFAP+ a través del software *FIJI* (v.2.0.0)¹ y con el *plugin* Analyze Skeleton² con el fin de analizar la longitud de la ramificación y la ramificación de la microglía. La descripción de los

¹ <https://imagej.net/Fiji>

² <https://imagej.net/AnalyzeSkeleton>

pasos realizados para el análisis de las imágenes se muestra en la Tabla 4 (Young & Morrison, 2018).

Tabla 4. Protocolo aplicado para el análisis de las fotomicrografías con Iba-1⁺

1. En el software FIJI se procedió a aplicar un filtro gaussiano para corrección del sombreado y suavizado de la imagen [**Process | FFT | Bandpass Filter**; filter up to 3 pixels, down to 40, no stripe suppression].
2. Posteriormente se procedió a convertir la imagen a escala de grises (8-bit) [**Image | Type | 8-bit**].
3. Se realizó el ajuste del brillo y contraste en caso de que la imagen fuera débil o los procesos de la microglía no fueran visibles [**Adjust | Brightness/Contrast**].
4. Se aplicó una máscara de enfoque [**Process | Filters | Unsharp Mask**] y posteriormente se removió la “sal y pimienta” o granulado generado al aplicar la máscara [**Process | Noise | Despeckle**].
5. Se procedió a convertir la imagen en un formato binario (es decir, se estratificó la imagen en características de interés vs el fondo) [**Image | Adjust | Threshold**]. A la imagen resultante se la aplicaron las funciones de:
 - a. “Despeckle” para eliminar el ruido de un solo pixel restante [**Process | Noise | Despeckle**].
 - b. “Close-” es un *plugin* que conecta dos píxeles oscuros si están separados por hasta dos píxeles [**Process | Binary | Close-**].
 - c. “Remove outliers” que reemplaza un píxel atípico brillante u oscuro por los píxeles medianos en el área circundante si se desvía por más de un determinado valor (el umbral) [**Process | Noise | Remove outliers; pixel radius: 2, threshold: 50**].
 - d. Se guardó la imagen para futura referencia.
6. Se realizó la “eskeletonización” de la imagen [**Process | Binary | Skeletonize**].
7. Finalmente analizamos la imagen “eskeletonizada” mediante el plugin AnalyzeSkeleton(2D/3D) y se copiaron los datos resultantes de *Results* y *Branch information* a una base de datos de Excel [**Analyze | Skeleton | Analyze Skeleton**].

Proceso obtenido y modificado de: Young & Morrison, 2018

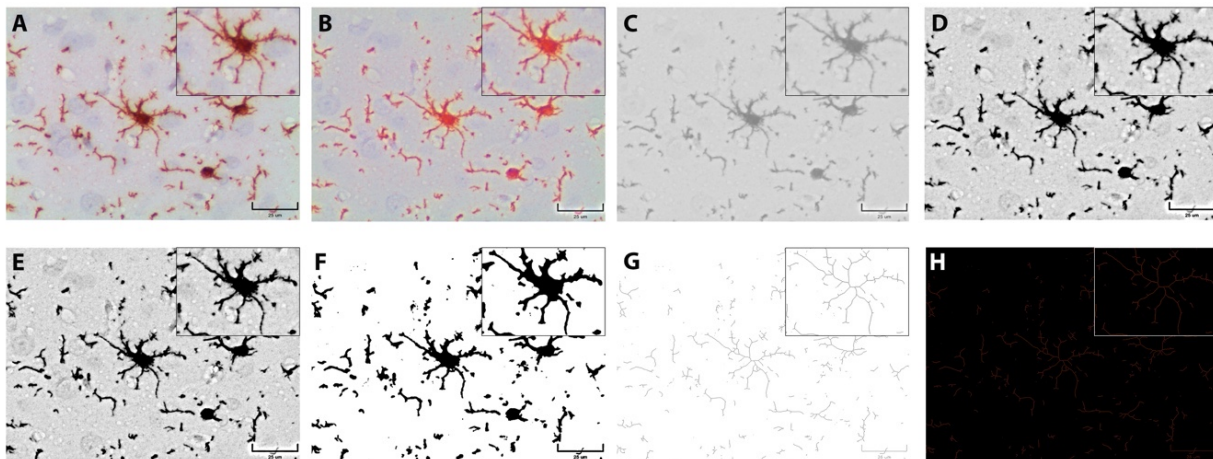


Figura 9. Imágenes de la secuencia de pasos del protocolo aplicado a las fotomicrografías con Iba-1⁺. Fotomicrografía original (A); después de aplicarle un filtro gaussiano (B); conversión a escala de grises [8-bit] (C); ajuste del brillo y contraste (D); máscara de enfoque y remoción de “sal y pimienta” (E); imagen binarizada (F); imagen eskeletonizada (G); imagen final con los datos de análisis (H).

(E); conversión a formato binario [Threshold] con aplicación de funciones despecke, close- y remove outliers (F); imagen “eskeletonizada” (G) y análisis mediante el plugin AnalyzeSkeleton(2D/3D) (H).

En la **Figura 9** se pueden observar los pasos detallados de la Tabla 4, a partir de los cuales se obtuvieron las imágenes “eskeletonizadas” de las fotomicrografías con inmunomarcado para Iba-1⁺.

7.6 Obtención de muestras y ELISA

Previa administración de una sobredosis con pentobarbital sódico (Pisabental®, 50 mg/kg *i.p.*, PiSA Agropecuaria, Hgo., México) 24 ó 72 h después de la inducción del TCE se realizó la eutanasia, se aisló el cerebro y se realizó la disección del hipocampo ipsilateral al TCE. Todo el hipocampo fue sonificado en un buffer de Tris-HCl, con un coctel de inhibidores de proteasas (aprotinina (3 mg/ml), DTT (1M) y PMSF (13.9 mg/ml)). Las muestras fueron almacenadas en alícuotas de 500 µl a – 80 °C hasta la medición. Se determinó por duplicado, con un límite de detección de 5pg/mL, la cantidad de IL-1β mediante kit de ELISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (E-EL-R0012; Elabscience Biotechnology Inc.).

7.7 Análisis estadístico

Los resultados fueron reportados como valores medios ± errores estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés). El análisis estadístico fue realizado utilizando en el Software GraphPad Prism versión 8.4.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A menos que se indique lo contrario, los datos cumplen con los supuestos de varianzas iguales. La significancia estadística se evaluó con un análisis de varianza (ANOVA de 2 vías) y las correcciones de comparaciones múltiples de Tukey para la ingesta de alimento, peso corporal, prueba de cilindro y el recuento neuronal; para la escala neuroconductual y los errores en la prueba de caminata en barra se usó la prueba de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney como *post hoc*. Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1. Diferencias en la ingesta de comida de la rata dependiendo de la hora a la que se indujo el TCE

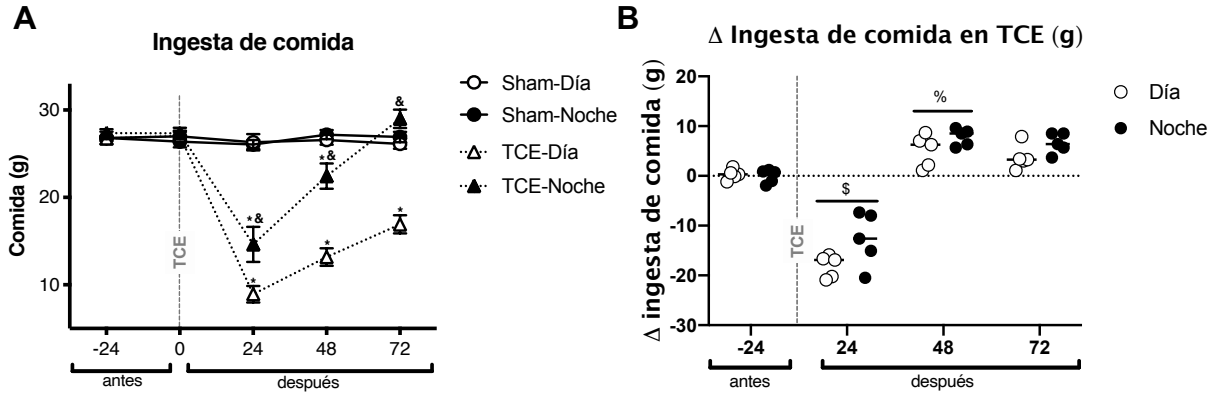


Figura 10. La hora del día en que se induce el TCE determina la respuesta en la ingesta de comida de la rata. Efecto de inducir el TCE en dos diferentes puntos de tiempo, en el día (símbolos blancos) y en la noche (símbolos negros), sobre la ingesta de alimentos (**A**) y la diferencia (Δ) en la ingesta de comida en los grupos de TCE (**B**) ($n = 5$ cada subgrupo). Los datos se expresan como media \pm SEM. Prueba de ANOVA de dos vías y prueba de Tukey como *post hoc*. * $p < 0.05$ entre los grupos TCE y Sham; & $p < 0.05$ entre los grupos de Día y Noche; § $p < 0.05$ entre basal (-24 h) y 24 h después del TCE; % $p < 0.0001$ entre 24 h y 48 h después del TCE.

La ingesta de comida (**Figura 10A**) mostró diferencias en los grupos de Día (13:00) y Noche (01:00) a las 24, 48 y 72 h después del TCE al compararlos cada uno con su ingesta basal ($F_{4,64} = 59.05$, $p < 0.0001$); sin embargo, aunque en ambos se observó una tendencia al incrementar la ingesta a las 24 y 48 h postrauma, solamente el grupo con inducción de TCE en la noche mostró un aumento que se volvió no significativo al compararlo con su respectivo grupo Sham ($p = 0.38$) a las 72 h después del TCE. Por otro lado, encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo de Día con el grupo de Noche ($F_{3,16} = 73.73$, $p < 0.0001$), teniendo una mayor disminución el grupo de Día a las 24 h ($p < 0.0001$), 48 h ($p < 0.0001$) y 72 h ($p < 0.0001$) posteriores al trauma.

Respecto a la Δ en la ingesta de comida para los grupos con solo el TCE (**Figura 10B**), observamos una gran influencia del tiempo posterior al trauma, al encontrar una mayor diferencia a las 24 h después del trauma ($F_{3,32} = 130.8, p < 0.0001$); sin embargo, esta diferencia no se observó a las 48 h después del trauma, siendo ésta estadísticamente significativa respecto a las 24 h previas ($p < 0.0001$). De forma interesante, esta diferencia ya no se encontró al comparar el grupo de 48 h vs 72 h posteriores al TCE, ni en el grupo de Día ($p = 0.9947$), ni en el grupo de Noche ($p = 0.9961$).

Finalmente, aunque nuestro análisis estadístico determinó que también existía influencia de los grupos de Día y de Noche ($F_{1,32} = 9.261, p < 0.0001$), el análisis *post-hoc* no arrojó diferencias entre los grupos de Día y Noche en los puntos -24 h ($p > 0.999$), 24 h ($p = 0.070$), 48 h ($p = 0.763$) y 72 h ($p = 0.743$) después del TCE.

8.2. Variaciones en el peso corporal de la rata dependiendo de la hora a la que se indujo el TCE

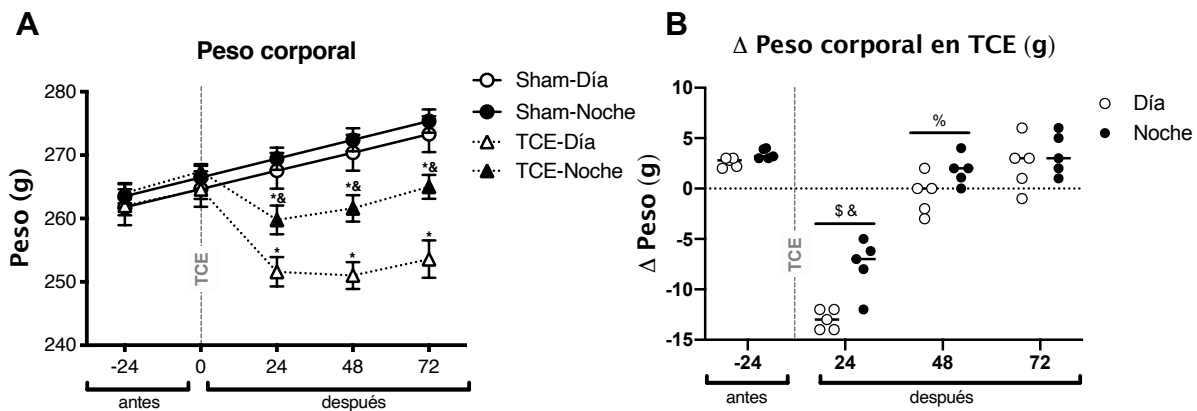


Figura 11. La hora del día en que se induce el TCE determina la respuesta en el peso corporal de la rata. Efecto de inducir el TCE en dos diferentes puntos del ciclo luz-oscuridad, en el día (símbolos blancos) y en la noche (símbolos negros), sobre el peso corporal (**A**) y el Δ del peso corporal en los grupos de TCE (**B**) ($n = 5$ cada subgrupo). Los datos se expresan como media \pm SEM. Prueba de ANOVA de dos vías y prueba de Tukey como *post hoc*. * $p < 0.05$ entre los grupos TCE y Sham; & $p < 0.05$ entre los grupos de día y noche; § $p < 0.05$ entre basal (-24 h) y 24 h después del TCE; % $p < 0.0001$ entre 24 h y 48 h después del TCE.

Un comportamiento similar a la ingesta de comida se observó en el peso corporal (**Figura 11A**) y en el Δ del peso de las ratas (**Figura 11B**). Encontramos diferencias en los grupos de Día (13:00) y Noche (01:00) al compararlos cada uno con su peso corporal basal ($F_{4,64} = 53.07, p < 0.0001$). Por su parte, la comparación entre el grupo de Día y Noche ($F_{3,16} = 44.69, p < 0.0001$) mostró que el peso corporal de las ratas traumatizadas durante el día presentó una mayor disminución a las 24 h posttrauma ($p < 0.0001$), lo cual se mantuvo a las 48 h ($p < 0.0001$) y 72 h ($p < 0.0001$) después del trauma. Aunque en ambos grupos, tanto de Día como de Noche, se observa una tendencia al aumento de peso, al analizar el Δ del peso corporal solo en los grupos con TCE (**Figura 10B**), observamos una mayor diferencia tanto de Día como de Noche a las 24 h después del trauma ($F_{3,32} = 125.4, p < 0.0001; p < 0.0001$), la cual presenta una recuperación a las 48 h después del TCE, tanto para el grupo de Día ($p < 0.0001$) como para el grupo de Noche ($p < 0.0001$), diferencia que se mantuvo a las 72 h después del TCE y ya no resultó diferente significativamente respecto a las 48 h previas, tanto para el grupo de Día ($p = 0.1763$) como para el grupo de Noche ($p = 0.8530$).

Finalmente, la comparación entre el grupo de Día y Noche ($F_{1,32} = 17.95, p = 0.0002$) mostró una diferencia significativa, presentando a las 24 h después del TCE una menor diferencia de peso el grupo de Noche respecto al grupo de Día ($p = 0.0010$).

8.3. Diferencias en las pruebas de conducta motora dependiendo de la hora de inducción del TCE.

Con el propósito de evaluar diferentes aspectos motores aplicamos la escala neuroconductual (de 21 pts.) (**Figura 12**) en la que se observó una disminución en el puntaje en el grupo con TCE de Día al compararlo con su grupo Sham, a las 24 h ($p < 0.0001$) y a las 72 h después del trauma ($p < 0.001$).

Por otro lado, las ratas con inducción del TCE durante la noche también presentaron una disminución en el puntaje a las 24 h ($p < 0.0001$) y a las 72 h ($p < 0.0001$) al

compararlos con su correspondiente grupo Sham. Sin embargo, el análisis entre el grupo de Día y el grupo de Noche mostró diferencias estadísticamente significativas, resultando en un mejor puntaje en el grupo de la Noche tanto a las 24 h ($p < 0.0001$) como a las 72 h ($p < 0.0001$) al compararlos con el grupo de Día.

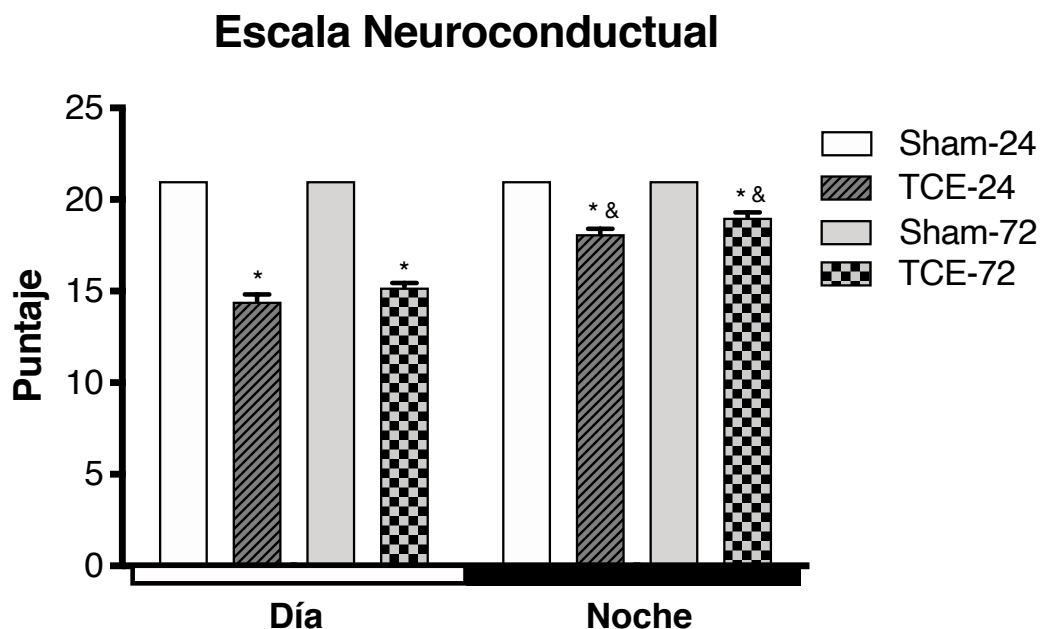


Figura 12. Puntaje en la escala neuroconductual dependiendo de la hora de inducción del TCE. Nótese la disminución significativa en ratas con TCE durante el día (13:00) en comparación con las ratas sometidas al TCE durante la noche (01:00). Los datos son expresados como promedio \pm SEM. Prueba de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney como *post hoc*, * $p < 0.05$ entre los grupos TCE y Sham; & $p < 0.05$ entre los grupos de Día y Noche.

En la **Tabla 5** se presenta una descripción detallada de cada parámetro específico de la escala neuroconductual de 21 puntos. Encontramos una disminución estadísticamente significativa en relación con su medición basal en el grupo de Día 24 y 72 h después de un TCE en: la colocación de patas ($p < 0.05$), barra horizontal ($p < 0.05$), plataforma inclinada ($p < 0.05$), rotación ($p < 0.05$), alcance visual de patas delanteras ($p < 0.05$), circulación ($p < 0.05$), motilidad ($p < 0.05$) y condiciones generales ($p < 0.05$). Aunque observamos una tendencia a aumentar a las 72 h después del trauma en 9 parámetros, a excepción de la motilidad la cuál disminuyó; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Por otro lado, en el grupo de Noche, a las 24 h después del trauma encontramos una disminución estadísticamente significativa en solo tres parámetros: barra horizontal ($p < 0.05$), rotación ($p < 0.05$) y condiciones generales ($p < 0.05$). A pesar de que a las 72 h después del trauma distinguimos una tendencia a aumentar en la colocación de patas, barra horizontal, el alcance visual de patas delanteras y la rotación, fue solo en la última que encontramos una diferencia significativa en comparación con las 24 h ($p < 0.05$). Por el contrario, observamos parámetros que disminuyen su puntuación en comparación con las 24 h, como la circulación, la motilidad y condiciones generales, sin embargo, ninguno de ellos fue estadísticamente significativo.

Al comparar el grupo de Día vs. De Noche a las 24 y 72 h después del trauma, encontramos que la posición de patas ($p < 0.05$) y la rotación ($p < 0.05$) obtuvieron mejores resultados en el grupo de Noche; la plataforma inclinada ($p < 0.05$) y la circulación ($p < 0.05$) solo obtuvieron mejores resultados y fueron estadísticamente significativos a las 24 h después del TCE; la barra horizontal ($p < 0.05$) y el alcance visual de patas ($p < 0.05$) fueron significativamente diferentes solo a las 72 h después del trauma. Finalmente, observamos parámetros que nunca fueron modificados, como los reflejos correctos y el reflejo contralateral.

8.3.1 Análisis en la prueba neuroconductual por parámetro dependiendo de la hora de inducción del TCE

Tabla 5. Análisis de parámetros individuales de la escala neuroconductual.

Parámetro (Puntaje máximo)	Día (n=10)			Noche (n=10)			Kruskal- Wallis
	Basal	24 h	72 h	Basal	24 h	72 h	
Colocación de patas (4)	4	2.6 ± 0.34*	2.8 ± 0.20*	4	3.7 ± 0.15 ^{&}	3.9 ± 0.10 ^{&}	< 0.0001
Reflejos correctos (1)	1	1 ± 0.00	1 ± 0.00	1	1 ± 0.0	1 ± 0.0	n.s.
Barra horizontal (3)	3	1.9 ± 0.18*	2.1 ± 0.28*	3	2.3 ± 0.21*	2.8 ± 0.13 ^{&}	< 0.0001
Plataforma inclinada (3)	3	2.2 ± 0.29*	2.5 ± 0.17*	3	2.9 ± 0.10 ^{&}	2.9 ± 0.10	= 0.0011
Rotación (2)	2	0.9 ± 0.10*	1.2 ± 0.20*	2	1.4 ± 0.16*, ^{&}	2.0 ± 0.00 ^{&} , ^{\$}	< 0.0001
Alcance visual de patas delanteras (2)	2	1.6 ± 0.16	1.6 ± 0.16*	2	1.7 ± 0.15	2.0 ± 0.00 ^{&}	= 0.0178
Reflejo contralateral (1)	1	1 ± 0.00	1 ± 0.00	1	1 ± 0.00	1 ± 0.00	n.s.
Circulación (1)	1	0.3 ± 0.15*	0.4 ± 0.16*	1	0.9 ± 0.10 ^{&}	0.8 ± 0.13	= 0.0002
Motilidad (2)	2	1.9 ± 0.10	1.6 ± 0.16*	2	1.9 ± 0.10	1.5 ± 0.17*	= 0.0104
Condiciones generales (2)	2	1 ± 0.00*	1.0 ± 0.00*	2	1.3 ± 0.15*	1.1 ± 0.10*	< 0.0001
Total (21)	21	14.4 ± 0.40	15.2 ± 0.25	21	18.1 ± 0.27	19 ± 0.29	< 0.0001

Los datos están expresados como promedio ± SEM. Prueba de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney como *post hoc*. * $p < 0.05$ vs. sham; [&] $p < 0.05$ Día vs Noche; ^{\$} $p < 0.05$ vs. 24 h; n.s.: no significativo.

8.4. Diferencias en la prueba de cilindro dependiendo de la hora de inducción del TCE

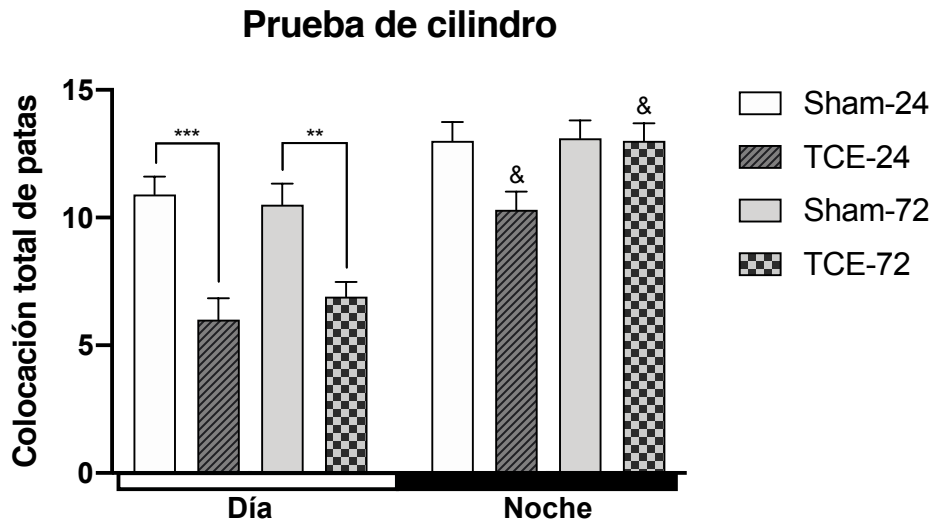


Figura 13. Puntuación en la prueba de cilindro dependiendo de la hora de inducción del TCE. Observamos una disminución significativa en las ratas sometidas a TCE durante el día (13:00) en comparación con las ratas sometidas al trauma durante la noche (01:00). Los datos se expresan como promedio \pm SEM. ANOVA de dos vías y prueba Tukey como *post hoc*, *** $p = 0.0001$ entre sham-24 and TCE-24, ** $p = 0.0057$ entre sham-72 y TCE-72, & $p < 0.0001$ entre TCE-24 and TCE-72 día vs. noche.

Con el objetivo de evaluar la exploración espontánea y la asimetría entre las extremidades, posterior al TCE aplicamos la prueba de cilindro (**Figura 13**). En el grupo de Día encontramos diferencias en el tiempo después de la inducción del trauma ($F_{3,54} = 11.84$, $p < 0.0001$), tanto a las 24 h ($p < 0.0001$) como a las 72 h ($p < 0.0001$) después del TCE al compararlos con los grupos Sham. Sin embargo, las ratas con TCE en la noche no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la colocación total de patas a las 24 h ($p = 0.057$) o a las 72 h ($p = 0.999$) al compararlos con sus respectivos grupos Sham.

Finalmente, encontramos diferencias significativas en la exploración espontánea al comparar los grupos sometidos a TCE entre el día y la noche ($F_{1,18} = 53.93$, $p < 0.0001$) en los cuales, la puntuación del grupo con trauma en la noche fue mayor,

tanto a las 24 h ($p = 0.0004$) como a las 72 h ($p < 0.001$) en comparación con los grupos con TCE en el día.

8.5. Análisis de asimetría de extremidades en la prueba de cilindro

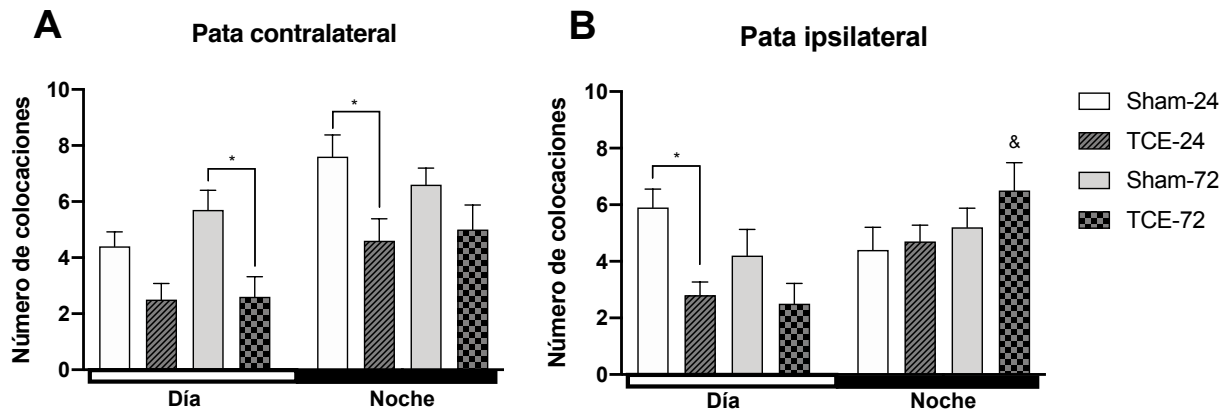


Figura 14. Colocación de cada pata en la prueba de cilindro. La pata contralateral se refiere a la pata derecha (**A**) e ipsilateral se refiere a la pata izquierda (**B**). Obsérvese la disminución significativa en la colocación de ambas patas en el grupo de día (13:00). En el grupo de la noche (01:00) aunque hubo disminución, la pata ipsilateral compensó la pérdida de función en la pata contralateral. Los datos son expresados como promedio \pm SEM. ANOVA de dos vías y prueba Tukey como *post hoc*; * $p < 0.05$ entre Sham y TCE; & $p = 0.0012$ entre TCE-72 día vs. noche.

Con el fin de analizar más a detalle la asimetría de extremidades en la prueba de cilindro, analizamos la colocación de cada una de las patas por separado (**Figura 14**). El conteo de la pata contralateral (pata derecha) (**A**) mostró diferencias significativas entre los grupos con TCE y sus respectivos Sham ($F_{3,54} = 7.208$, $p = 0.0004$), del grupo de Día, principalmente a las 72 h después del trauma ($p = 0.0211$). En el grupo de Noche, la diferencia en la asimetría de esa extremidad sólo se encontró a las 24 h después del TCE ($p = 0.0271$) pero no a las 72 h ($p = 0.418$) al compararlo con su correspondiente grupo Sham. El análisis entre el grupo de Día y de Noche mostró diferencias significativas ($F_{1,18} = 24.19$, $p = 0.0001$); sin embargo, el análisis *post hoc* no mostró diferencias entre los subgrupos de 24 h ($p = 0.155$) ni a las 72 h ($p = 0.0750$) después del trauma.

Por otro lado, el análisis de la asimetría en la pata ipsilateral (pata izquierda) (B), no mostró diferencias significativas por la hora de inducción del trauma ($F_{3,54} = 1.146$, $p = 0.338$). Sin embargo, en el grupo de Día el análisis *post hoc* mostró diferencias estadísticamente significativas entre en grupo de TCE y los subgrupos Sham a las 24 h ($p = 0.0311$), y no hubo diferencias en el grupo de la noche. Por último, al comparar el grupo de TCE de Día con el de Noche, encontramos un aumento estadísticamente significativo sólo hasta las 72 h después del trauma ($p = 0.0012$).

8.6. Análisis de la prueba de la prueba de caminata en barra dependiendo de la hora de inducción del TCE

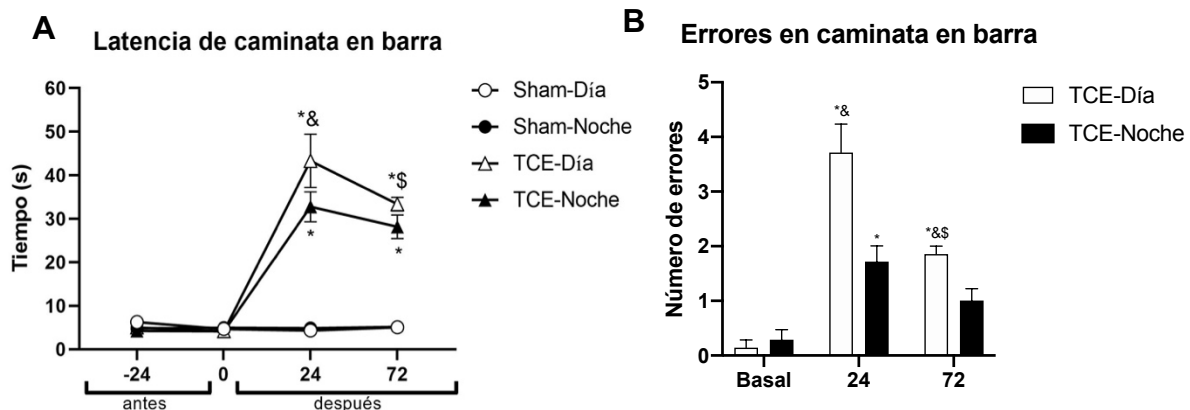


Figura 15. Análisis de la prueba de caminata en barra según la hora de inducción del TCE. Observámos un aumento en el grupo con TCE tanto en el grupo de día como el grupo de noche. Los datos son expresados como promedio \pm SEM. **(A)** ANOVA de 2 vías y prueba Tukey como *post-hoc*. * $p < 0.05$ entre TCE y sham; & $p < 0.05$ entre Día y Noche; \$ $p < 0.05$ entre 24 y 72 h. **(B)** Prueba de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney como *post-hoc*. * $p < 0.05$ entre TCE y Basal; & $p < 0.05$ entre Día y Noche; \$ $p < 0.05$ entre 24 y 72 h.

Para evaluar el déficit presentado después del trauma en la actividad motora fina, analizamos los resultados obtenidos de aplicar la prueba de caminata en barra. Los resultados de la latencia en la prueba (**Figura 15A**), arrojaron que el tiempo que tardaban las ratas en cruzar la barra a la caja de escape fue significativamente mayor en las ratas traumatizadas en comparación con su medición basal ($F_{3,96} = 81.17$, $p < 0.0001$) tanto para el grupo de Día a las 24 h ($p < 0.0001$) como a las 72

h ($p < 0.0001$) como en el grupo de Noche, a las 24 h ($p < 0.0001$) como a las 72 h ($p < 0.0001$).

De forma interesante, las ratas traumatizadas en el grupo de Día presentaron una reducción de la latencia a las 72 h después del trauma, al compararla con la medición con las 24 h post-TCE, reducción que fue estadísticamente significativa ($p = 0.0334$). Por otro lado, al comparar el efecto del ciclo, las ratas traumatizadas en el grupo de la Noche presentaron un menor tiempo de latencia respecto a las ratas traumatizadas en el grupo de Día ($F_{3,96} = 77.08$, $p < 0.0001$), diferencia que fue significativa sólo a las 24 h después del TCE ($p = 0.0170$) pero no a las 72 h ($p = 0.8699$).

En cuanto a la medición del número de errores en los grupos con TCE (**Figura 15B**), encontramos una influencia del tiempo, observamos un aumento 24 h después del trauma, tanto en el grupo de Día como de Noche respecto a su basal ($p < 0.05$), sin embargo, también encontramos una influencia del ciclo ya que el grupo de Noche presentó una menor cantidad de errores respecto al grupo de Día ($p < 0.05$). Finalmente, a las 72 h después del trauma, el grupo con TCE inducido en el Día presentó una disminución en el número de errores respecto a la medición de las 24 h post-TCE ($p < 0.05$), pero siguió presentando diferencias estadísticamente significativas respecto a su medición basal ($p < 0.05$); por otro lado, la comparación entre el grupo de Día y Noche resultó en una diferencia significativa ($p < 0.05$) y de forma interesante el grupo de la Noche ya no presentó diferencias estadísticamente significativas en comparación con su respectiva medición basal ($p = 0.4828$).

8.7. Observación y descripción macroscópica de los cerebros de rata

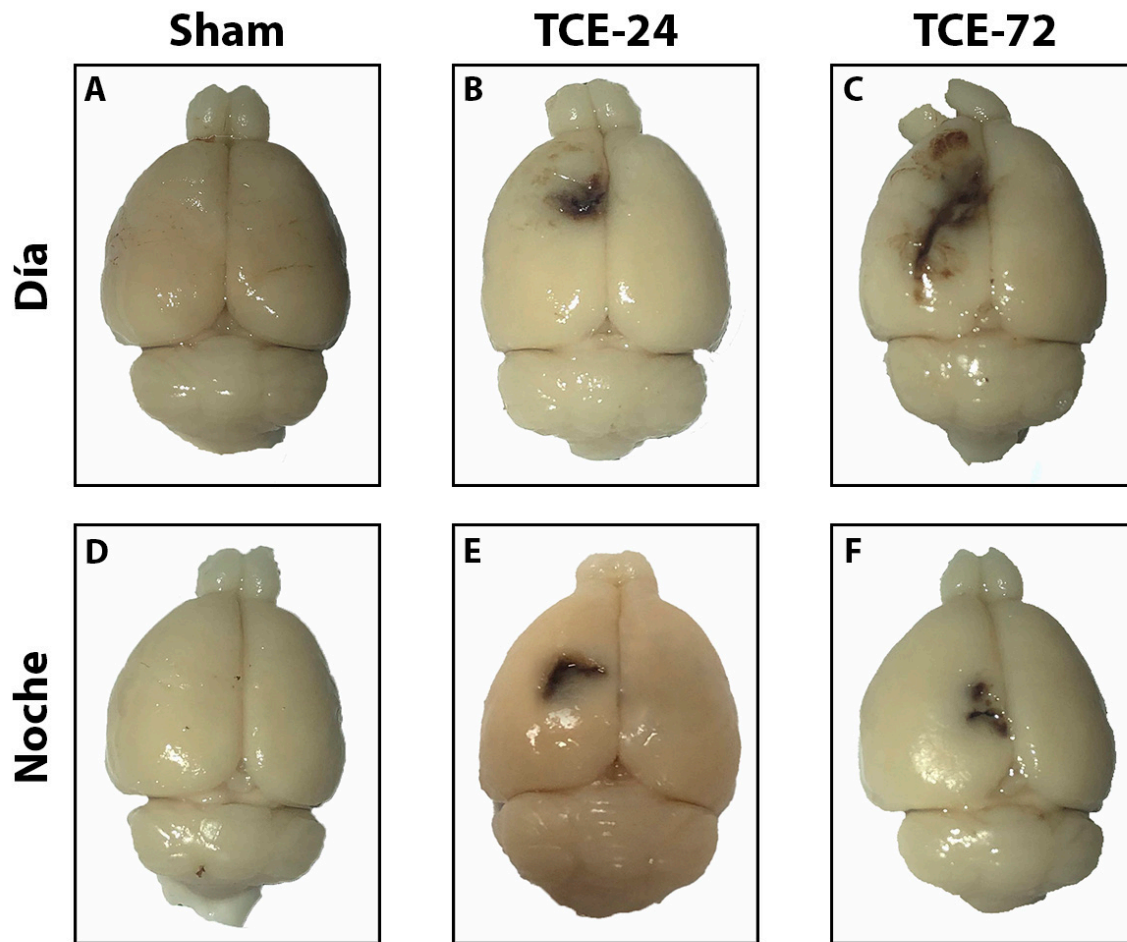


Figura 16. Observación macroscópica de cerebros de rata con inducción del modelo de TCE. Cerebros disecados de ratas del grupo de Día (**A-C**) y del grupo de Noche (**D-F**) en el grupo Sham (**A** y **D**), 24 h (**B** y **E**) y 72 h (**C** y **F**) después del TCE. Se observa el área de inducción del trauma en lo que correspondería a las coordenadas P= -2 y L= 1.4 de la corteza motora primaria [M1] de acuerdo con el Atlas de Paxinos y Watson. Mediante una descripción macroscópica general en el grupo con TCE durante el día, se puede apreciar un paulatino aumento del área del traumatismo de las 24 h (**B**) a las 72 h después del TCE. Por otro lado, en el grupo con inducción del trauma en la noche, el área presenta una aparente disminución de su extensión de las 24 h (**E**) a las 72 h (**F**) después del TCE.

8.8. Visualización panorámica de la zona del TCE en corteza motora y la región de hipocampo

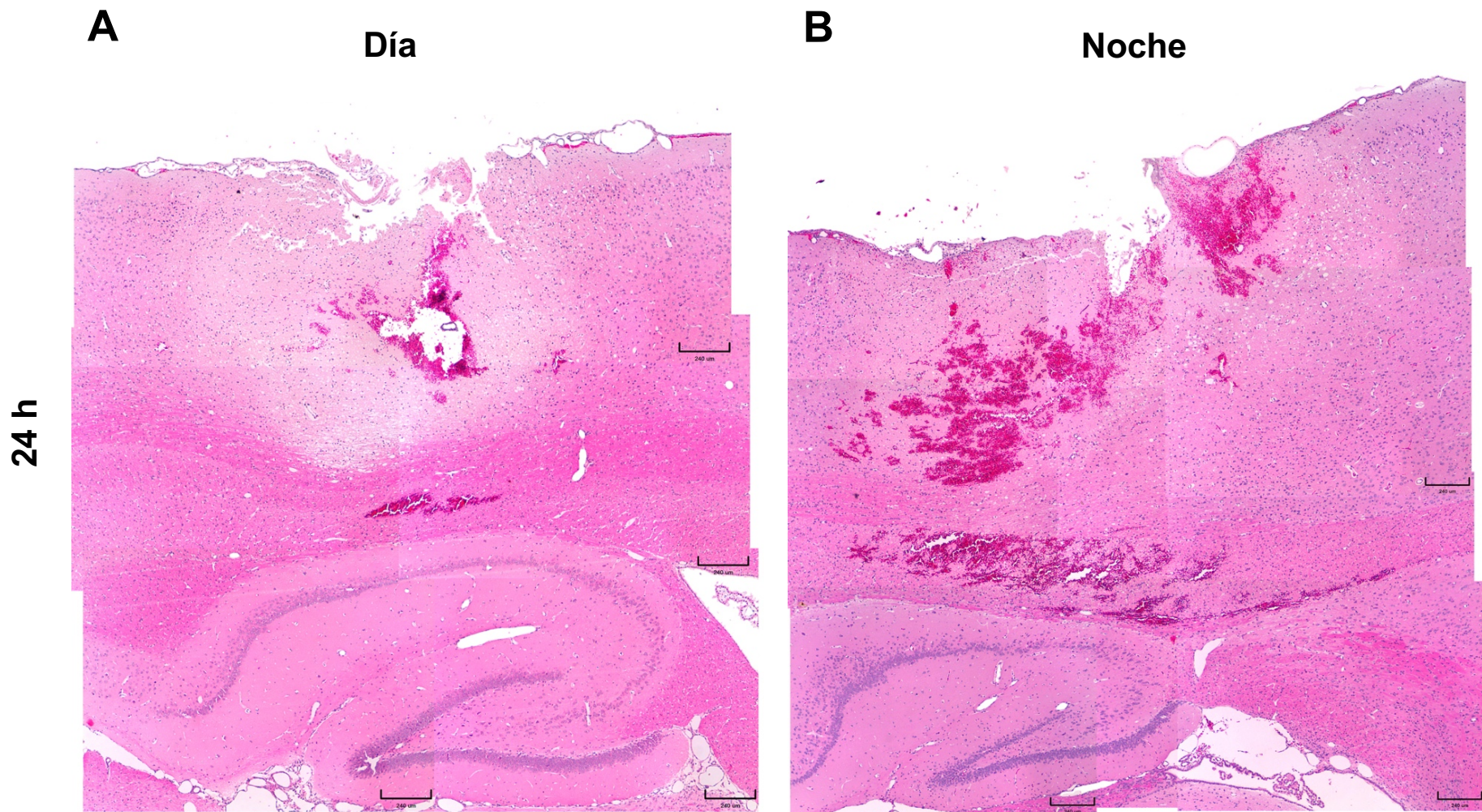


Figura 17. Ver página 55 para descripción

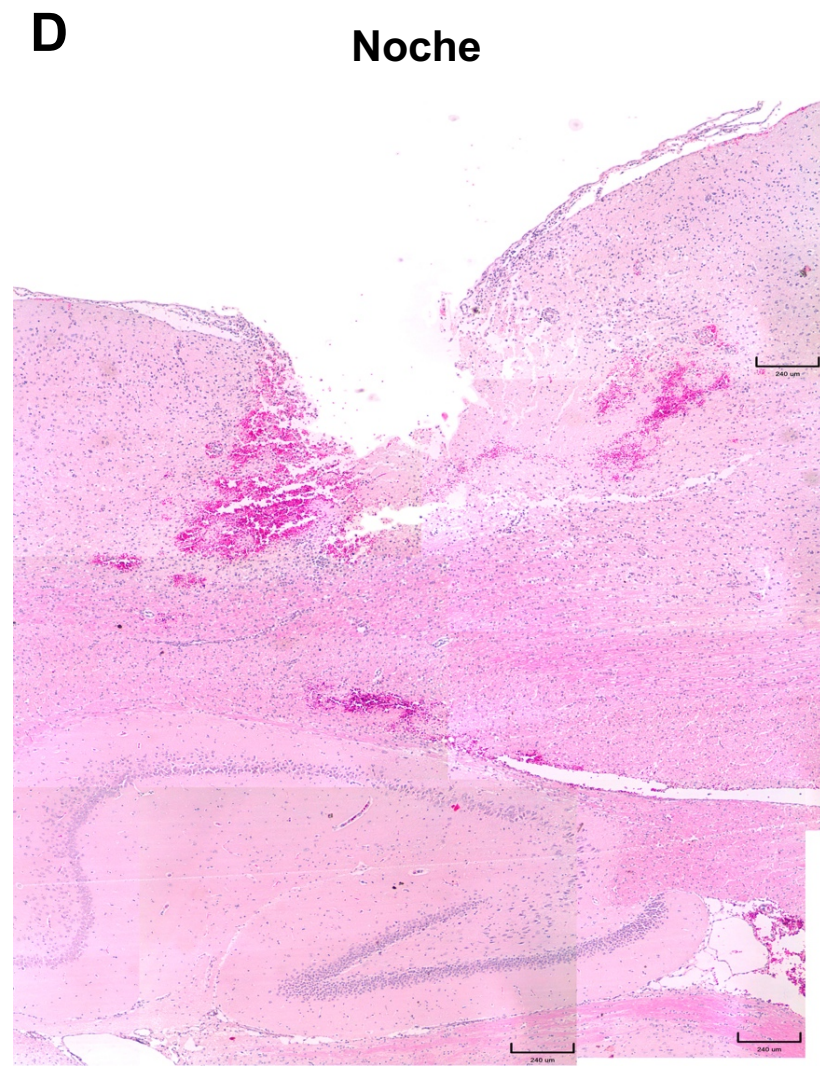
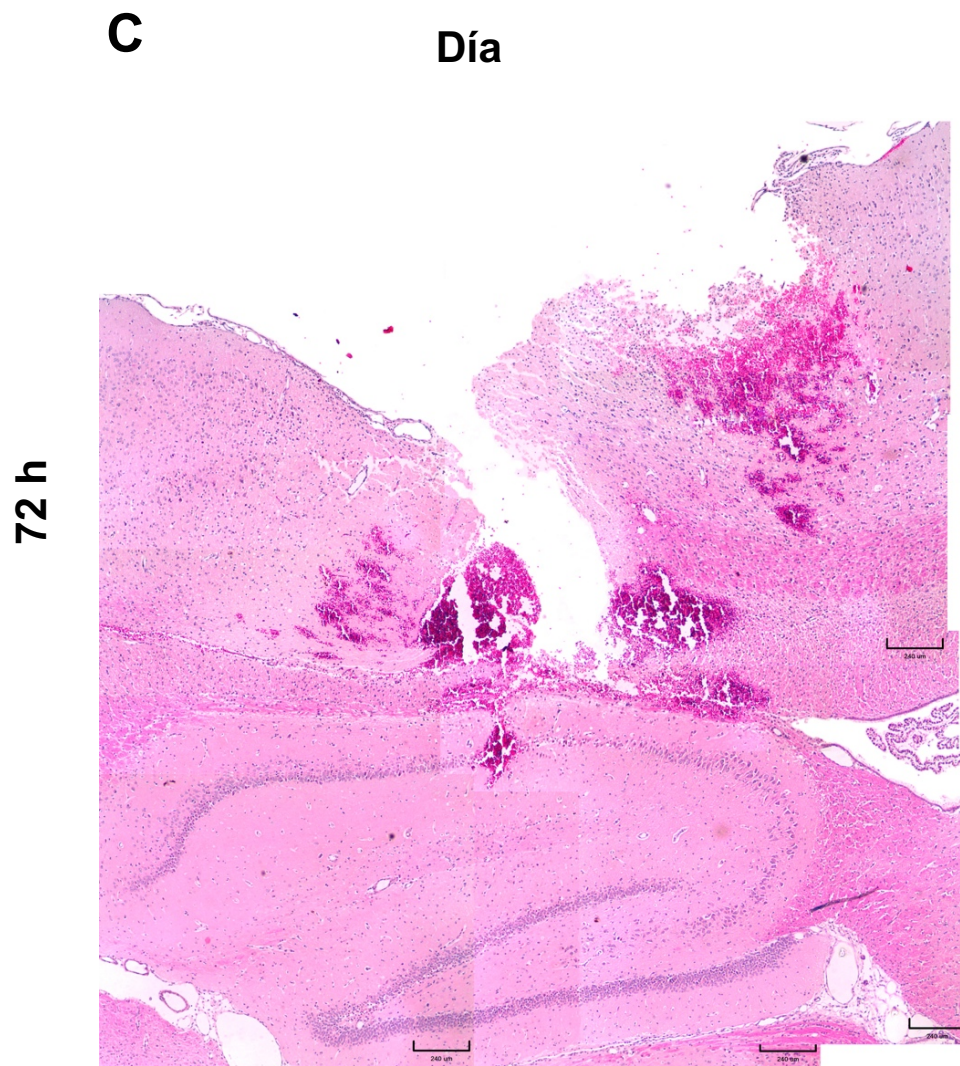


Figura 17. Ver página siguiente para descripción

Figura 17. Imágenes panorámicas de mosaico del TCE. Se puede apreciar la zona del daño primario (corteza motora) y su relación neuronatómica con el hipocampo en el grupo de Día y Noche a las 24 h (**A y B**, pág. 53) y a las 72 h después del trauma (**C y D**, pág. 54). Tinción HyE, (objetivo 4×); barras en referencias, 240 μm.

La observación macroscópica de la zona del trauma en corteza motora primaria [M1] nos muestra un aparente aumento de la zona de daño en el grupo con TCE de Día, de las 24 h a las 72 h, por el contrario, en el mismo lapso observamos una disminución de esta zona de daño en el grupo con TCE de Noche (**Figura 16**). La apreciación panorámica de esta zona de daño mediante un mosaico de fotos tomadas con el objetivo 4× y con las muestras histológicas teñidas con HyE, nos permitió valorar la zona de daño primario en corteza motora a las 24 h (**Figura 17A y B**) y a las 72 h (**Figura 17C y D**) después del trauma y la extensión del daño secundario a otras regiones neuroanatómicas como hipocampo.

La extensión del daño, caracterizado por pérdida de la estructura normal del tejido nervioso, sangrado y disminución de la intensidad de tinción del neuropilo, a las 24 h después del TCE, parece ser aparentemente mayor en el grupo de Noche, sin embargo, al comparar ambos grupos a las 72 h después del trauma, pudimos observar que esta extensión del daño fue mayor en las ratas traumatizadas durante el día, llegando a extenderse a estructuras neuroanatómicas adyacentes como la capa molecular y de células piramidales de la subregión de hipocampo CA1 (**Figura 17C**), mientras que el grupo con trauma en la noche apreciamos un aparente disminución del sangrado y una relativa mayor preservación del tejido nervioso.

Para determinar si el daño evaluado por las pruebas neuroconductuales se asociaba con el daño morfológico, se obtuvieron secciones de tejido cerebral embebidas en parafina, fijadas con formol y teñidas con HyE, en las cuales se examinó la zona perilesional del sitio de TCE (corteza motora) con un microscopio óptico. En la **Figura 18** se muestran las fotomicrografías de corteza cerebral motora en el grupo de Día (A-C) y el grupo de Noche (D-F). No se presentan hallazgos como congestión

vascular, vasodilatación, hemorragia y necrosis (datos no mostrados en las fotomicrografías) en la zona perilesional en TCE para resaltar los cambios neuronales. Se observó un incremento en la basofilia neuronal (flecha) 24 h después del TCE en la lámina 3 (capa de neuronas piramidales externa) y de la vasodilatación (v) de la corteza motora en ambos grupos de Día (B) y de Noche (E). También, nótese la presencia de ND (cabeza de flecha) en el grupo de Día y la mejor preservación del neurópilo (asterisco rojo) en el grupo de Noche. A las 72 h después de la inducción del trauma, los cambios neuronales se mantuvieron con la persistencia de ND (cabezas de flecha) en el grupo con inducción del TCE durante el día (C), mientras que las neuronas en el grupo de Noche (F) algunas aparecieron normales (flecha blanca) y otras con cambios (flecha); los espacios perineuronales y la vasodilatación fueron más prominentes en el grupo con TCE durante el día (C) que en el grupo con inducción del trauma en la noche (F)

8.9. La hora del día en la que es inducido un TCE determina el grado de daño celular en la zona perilesional del trauma (corteza motora)

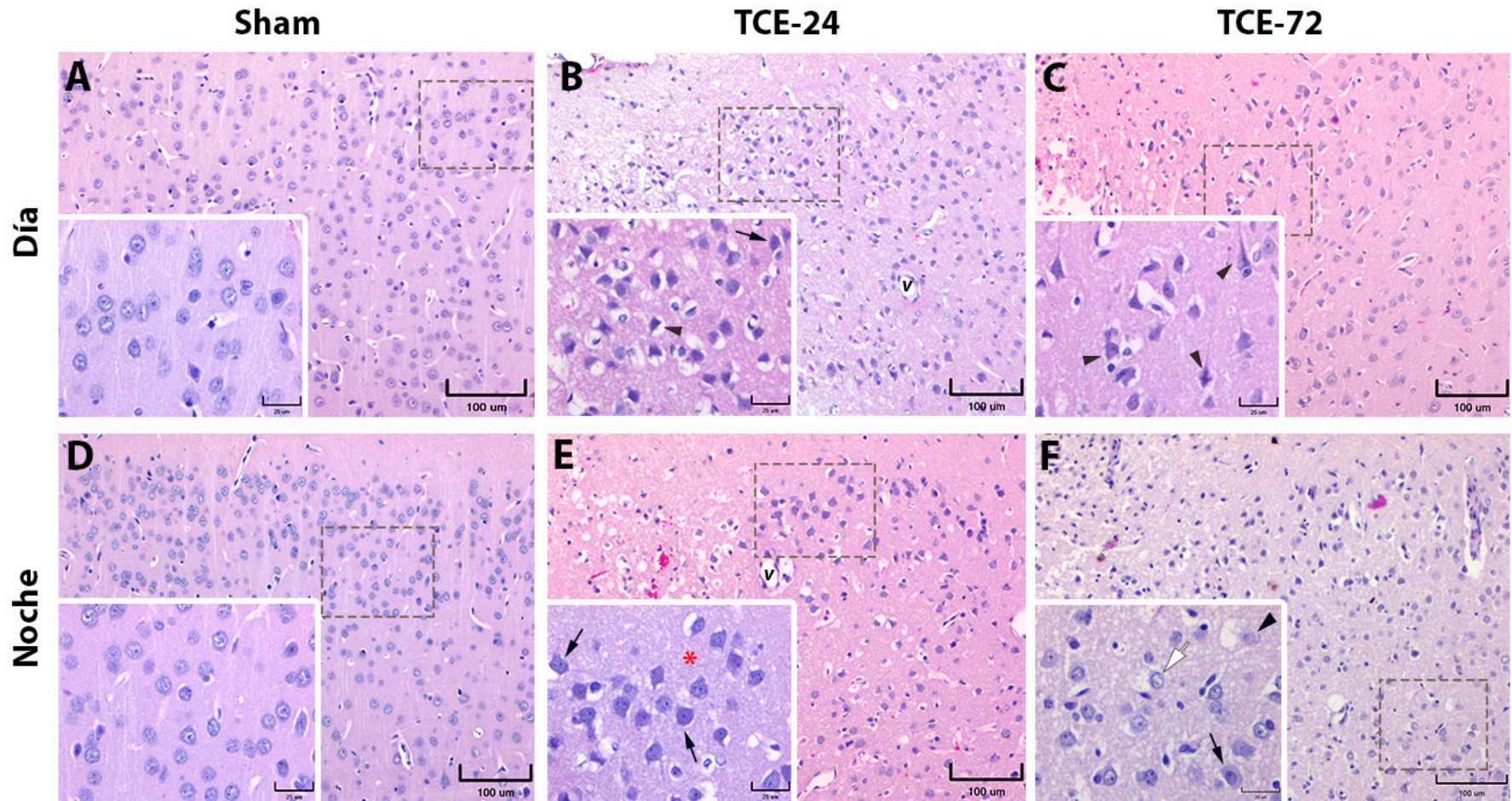


Figura 18. Histopatología con HyE de la zona perilesional (corteza motora). Se observa un menor daño celular y menor cantidad de ND en el grupo con TCE inducido en la noche. (n=4 cada columna). Barras en imágenes insertadas, 100 μm; barras en referencias, 25 μm.

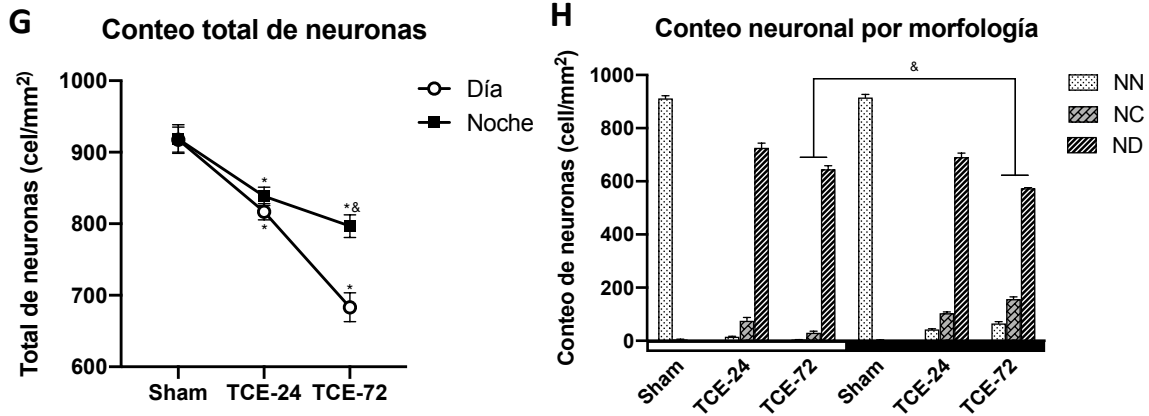


Figura 18. Cont. Conteo total de neuronas (G) y conteo de morfología neuronal (H).

Los datos son expresados como promedio \pm SEM. ANOVA de dos vías y prueba Tukey como *post hoc*. (G) * $p = 0.0001$ entre sham-24 and TCE-24, * $p = 0.0057$ entre sham y TCE; † $p < 0.0001$ entre TCE-72 día vs. noche.

El recuento total de neuronas (**Figura 18G**) en la zona perilesional del sitio de TCE (corteza motora) fue significativamente diferente, tanto en el tiempo (24 y 72 h) ($F_{2,12} = 173.9$, $p < 0.0001$) como en el grupo experimental (grupo de Día vs. grupo de Noche) ($F_{1,12} = 33.97$, $p < 0.0001$). El recuento total de neuronas en el subgrupo con TCE a las 24 h tanto en el día ($p < 0.0001$) como en los grupos de Noche ($p = 0.0008$) se redujo significativamente en comparación con los grupos Sham correspondientes. Sin embargo, a las 72 h, la disminución total de las neuronas se mantuvo en el grupo de Noche ($p = 0.0793$) pero disminuyó aún más en el grupo de Día ($p < 0.0001$). El análisis del recuento de neuronas en los grupos de Día y de Noche no mostró diferencias significativas a las 24 h después del TCE ($p = 0.6144$) pero se observaron diferencias estadísticamente significativas a las 72 h después del TCE ($p < 0.0001$).

Finalmente, en el conteo de morfología neuronal (**Figura 18H**) el número de NN fue considerablemente menor, mientras que NC y ND fueron altos a las 24 y 72 h después del TCE en ambos grupos experimentales (Día y noche). El efecto fue significativo en el recuento de NN para ambos puntos de tiempo (24 y 72 h) ($F_{2,12} = 10748$, $p < 0.0001$) y para ambos grupos experimentales (grupos de Día y de Noche)

($F_{2,12} = 29,15$, $p = 0.0002$). Después de 24 h del TCE, se observó una disminución significativa en NN tanto en el grupo de Día ($p < 0.0001$) como en el grupo de Noche ($p < 0.0001$) pero no se observaron diferencias entre ambos grupos. Sin embargo, a las 72 h después del TCE, hubo una diferencia significativa entre los grupos de Día y de Noche ($p = 0.0005$).

Con respecto al recuento de NC, se observó un efecto significativo en ambos puntos temporales ($F_{2,12} = 105.2$, $p < 0.0001$) y entre ambos grupos experimentales (Día y Noche) ($F_{1,12} = 80.46$, $p < 0.0001$). Sin embargo, no se observaron diferencias de NC a las 24 h en ambos subgrupos de TCE de los grupos de Día y de Noche ($p = 0.1069$), pero se observó una diferencia estadística entre los subgrupos de TCE de los grupos de Día y de Noche a las 72 h después del TCE ($p < 0.0001$).

Por su parte, el recuento de ND observamos una diferencia estadísticamente significativa en ambos puntos temporales ($F_{2,12} = 105.2$, $p < 0.0001$) y en ambos grupos experimentales (Día y Noche) ($F_{1,12} = 80.46$, $p < 0.0001$), en donde no hubo diferencias a las 24 h después del TCE entre los dos grupos ($p = 0.2895$). Sin

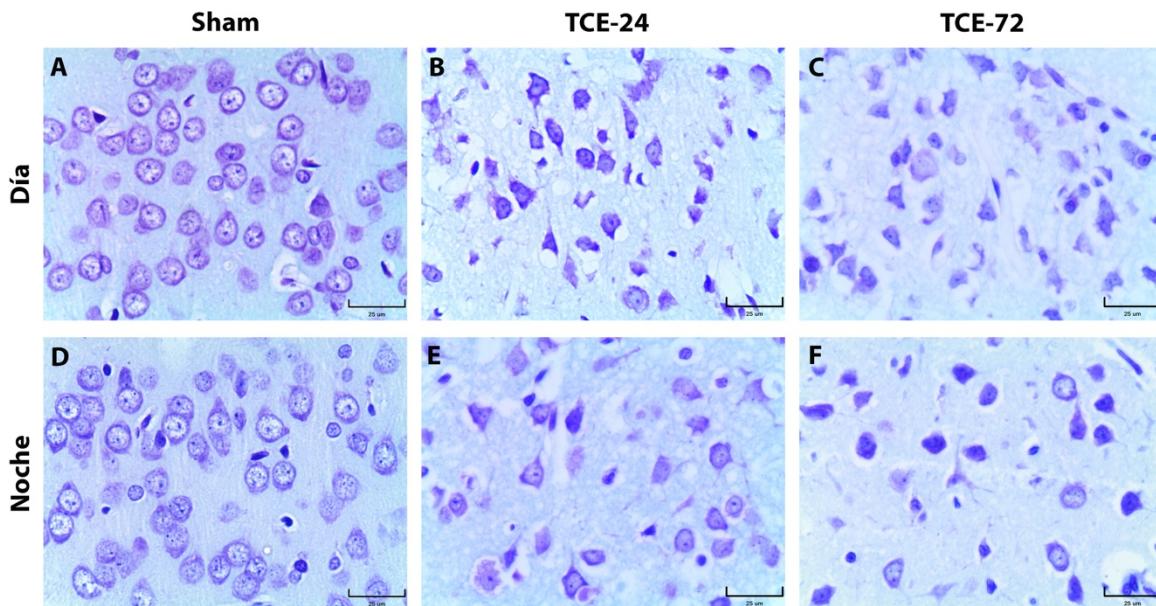


Figura 19. Histopatología con Nissl de la zona perilesional al TCE (corteza motora [M1]. (objetivo 40 ×); (Barras, 25 µm).

embargo, se observó una diferencia estadística entre los dos grupos a las 72 h después del TCE ($p = 0.0058$).

Finalmente, las fotomicrografías con la técnica de Nissl en la capa 3 de la corteza motora (**Figura 19**) mostraron similitudes histopatológicas con la técnica de HyE, en las cuáles apreciamos una marcada pérdida de neuronas en la corteza motora perilesional a la zona del TCE tanto en el grupo de Día (B) como de Noche (E), sin embargo, en el grupo de Día hay una mayor presencia de neuronas con aumento en la intensidad de la tinción.

8.10. El daño secundario neuronal posterior a un TCE presenta un patrón de variación diurna en las subregiones hipocampales CA1 y GD

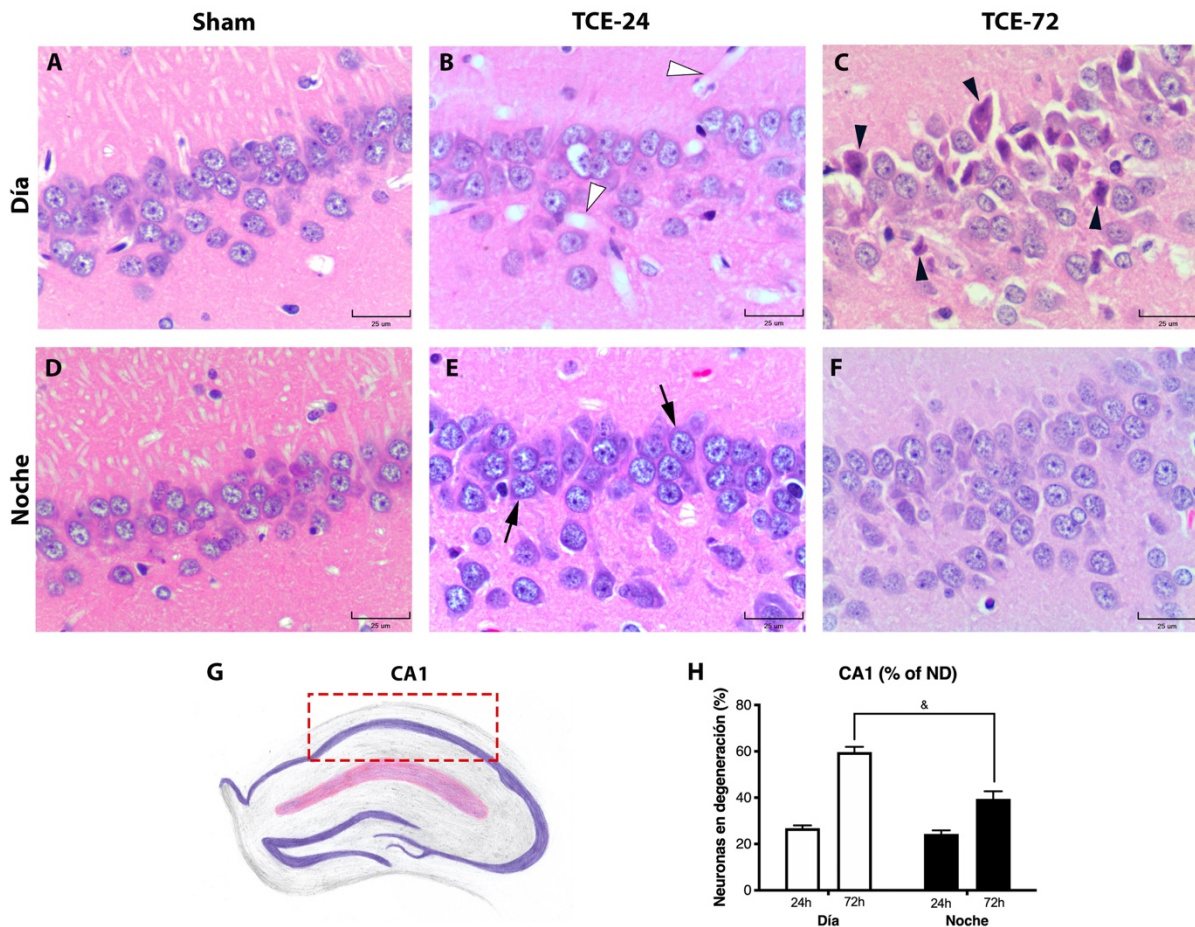


Figura 20. Histopatología de la subregion de hipocampo CA1 que mostró menos extensión del daño secundario en el grupo con TCE en la noche. Subregion hipocampal CA1 en el grupo de día (A-C) y en el grupo de noche (D-F); diagrama de la zona CA1 (D) donde se realizó la determinación del porcentaje de ND. Cálculo del porcentaje de ND para la subregion CA1 (H). Punta de flecha blanca: vasodilatación; flecha negra: basofilia; punta de flecha negra: eosinofilia. n=4 en cada columna. HyE. Los datos están expresados en promedio \pm SEM. ANOVA de dos vías y prueba Tukey como post hoc. $^{\&}p < 0.001$; (barras, 25 μ m).

El análisis histopatológico de la extensión del daño secundario después de un TCE incluyó la determinación del porcentaje de ND en tres diferentes subregiones hipocampales: *Cornu Ammonis* 1, 2, 3 (CA1, 2 y 3) y GD.

La subregión de hipocampo CA1 (**Figura 20**) en el grupo de día 24 h después de la inducción de TCE (B) no mostró cambios notables en la morfología neuronal, excepto la gran vasodilatación que no se observó en el grupo de Noche (E). Sin embargo, en el grupo de Noche, la capa de neuronas piramidales tenía mayor basofilia. A las 72 h después de la inducción del TCE, el grupo de Día (C) presentó una mayor cantidad de neuronas piramidales muertas, caracterizadas por núcleos picnóticos, retracción y eosinofilia citoplasmática, en comparación con las neuronas piramidales bien conservadas en el grupo de Noche (F).

Tanto en los grupos de Día como de Noche, se observó una gran dispersión de la capa de neuronas piramidales tanto a las 24 h (B, C) como a las 72 h (E, F) después del TCE en comparación con su respectivo grupo Sham (A, D). El análisis del porcentaje de ND en CA1 (H) mostró un efecto significativo en ambos puntos de tiempo (24 y 72 h) ($F_{1,8} = 117, p < 0.0001$) y en ambos grupos experimentales (Día y Noche) ($F_{1,8} = 26.14, p = 0.0009$). El análisis entre los grupos de Día y de Noche no mostró diferencias significativas en el ND a las 24 h ($p = 0.8555$), pero a las 72

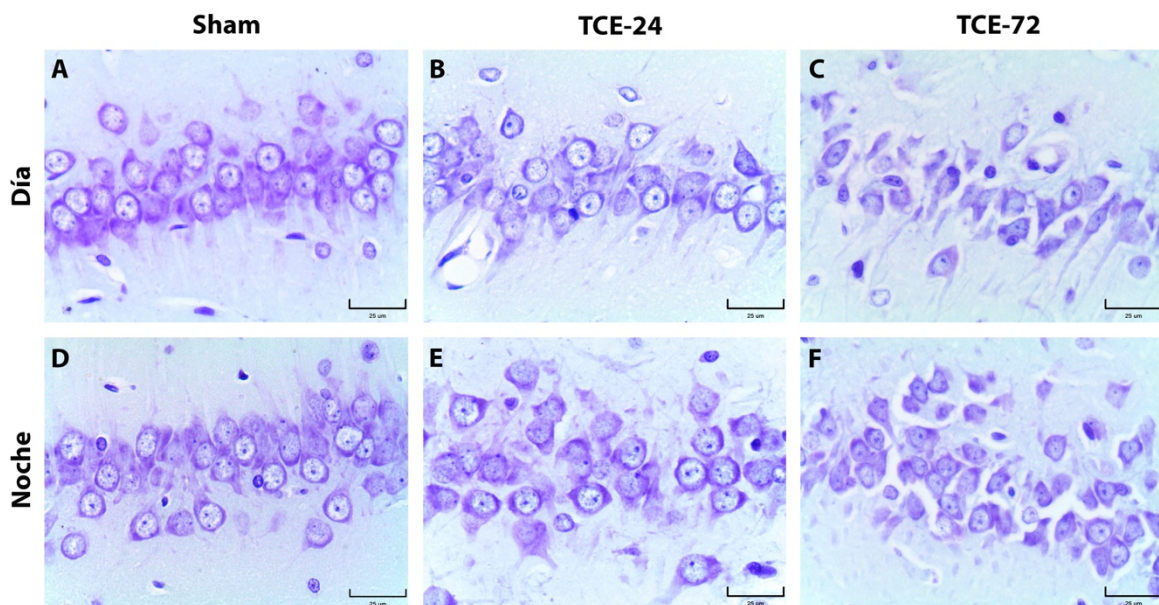


Figura 21. Histopatología con Nissl de la subregión de hipocampo CA1. Tinción de Nissl, (objetivo 40×); (barras, 25 µm).

h después del TCE, el grupo de Día tuvo un mayor porcentaje de ND en comparación con el grupo de Noche ($p = 0.0009$).

El análisis con la tinción de Nissl (**Figura 21**) demostró una pérdida en la disposición normal de la capa de células piramidales a las 24 h postrauma tanto en el grupo de Día (B) como de Noche (E) y en el grupo de Día se apreció una mayor vasodilatación. A las 72 h, el grupo con inducción del TCE en el Día (C), prácticamente perdió su capa piramidal y se observan cambios con retracción del núcleo, nucleolo hacia la periferia. En cambio el grupo de Noche, apenas comienza a presentar cambios asociados con la pérdida neuronal, sin embargo, es más evidente la presencia de neuronas con morfología normal.

Por otro lado, la subregión del GD (**Figura 22**) en el grupo de Día (A-C) 24 h después del TCE (B) mostró algunas ND en la capa granular, vasodilatación y astrogliosis. Por el contrario, 24 h después del TCE, el grupo de Noche (E) mostró pocos cambios histológicos en la capa granular. A las 72 h después de TCE se acentuaron los cambios morfológicos en el grupo de Día (C), particularmente la astrogliosis y la vasodilatación y las ND.

El grupo de Noche (F) presentó pocas neuronas disminuidas de tamaño y basófilicas en la capa granular. El porcentaje de ND (H) varió significativamente con el tiempo (24 y 72 h) ($F_{1,8} = 37.98$, $p = 0.0003$) y entre ambos grupos experimentales (Día y Noche) ($F_{1,8} = 15.86$, $p = 0.0040$). Además, el análisis estadístico entre los grupos de Día y de Noche no mostró diferencias significativas en las ND a las 24 h después del trauma ($p = 0.6157$), pero se encontró un aumento mayor en el grupo de Día en comparación con el grupo de Noche ($p = 0.0006$) a las 72 h.

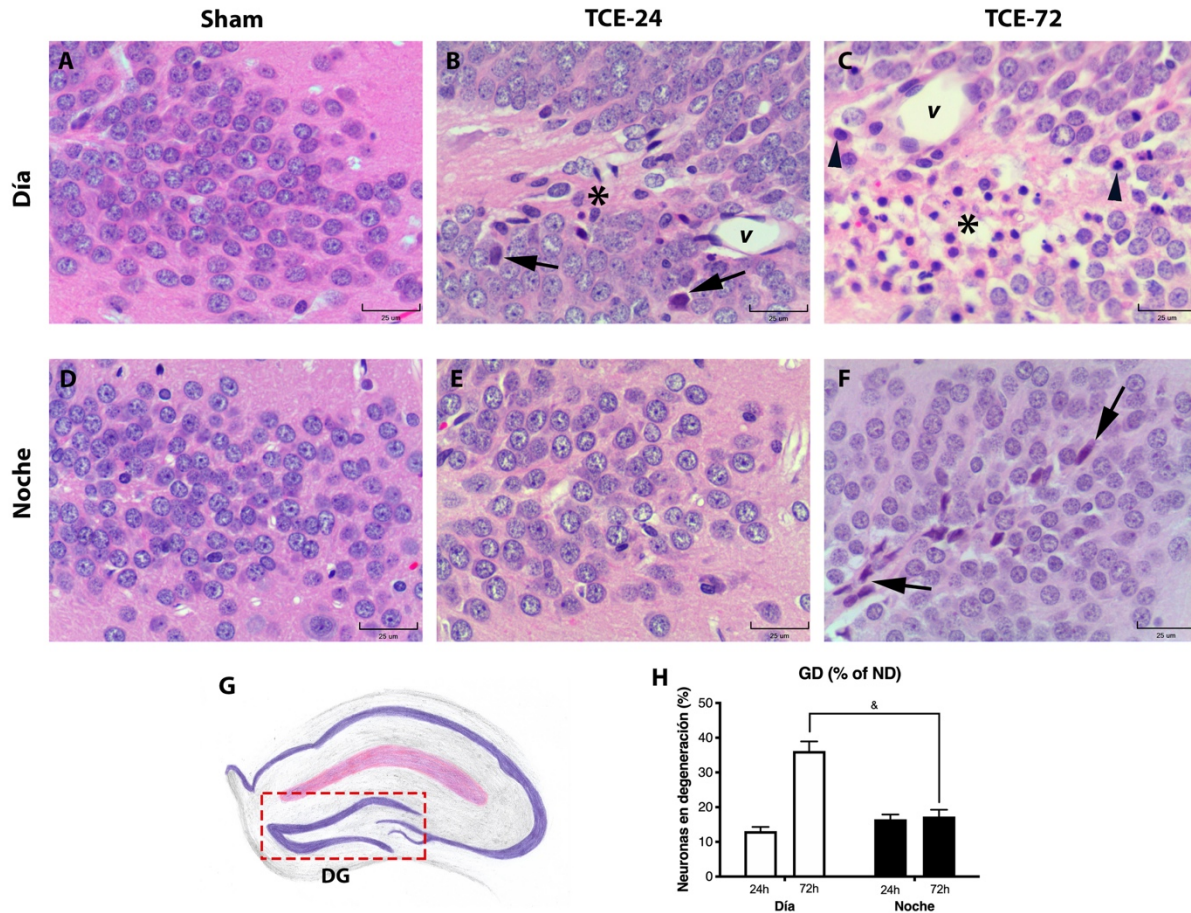


Figura 22. Histopatología de la subregión de hipocampo GD que mostraron menos extensión del daño secundario en el grupo con TCE en la noche. Subregión hipocampal de GD en el grupo de día (A-C) y en el grupo de noche (D-F); diagramas de la zona del GD (G) dónde se realizó la determinación del porcentaje de ND. Cálculo del porcentaje de ND en la zona de GD (H). Flecha negra: basofilia; v: vasodilatación; *: astrogliosis; punta de flecha negra: ND. n=4 en cada columna. HyE. Los datos están expresados en promedio \pm SEM. ANOVA de dos vías y prueba Tukey como post hoc. $^{\&}p < 0.001$; (barras, 25 μ m).

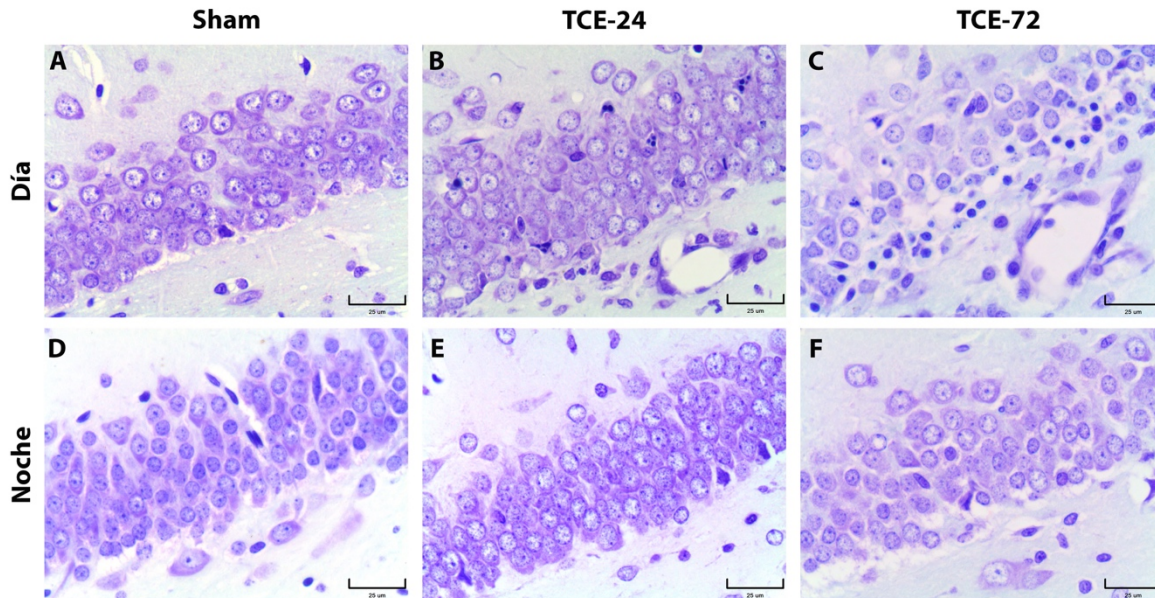


Figura 23. Histopatología con Nissl de la subregión de hipocampo GD. Grupo de Día (A-C) y grupo de Noche (D-E). (objetivo 4×); (barras, 25 µm).

Las preparaciones histológicas teñidas con la técnica de Nissl para la región de GD (**Figura 23**) mostraron una marcada vasodilatación en el grupo de Día tanto a las 24 (A) como a las 72 h (C) después del TCE, al igual que una pérdida considerable de somas neuronales de la capa granular en la hoja suprapiramidal y una extensa astrogliosis. Por el contrario, el grupo de la Noche mostró a las 24 h posteriores al trauma (E) una mayor conservación del tejido y fue hasta las 72 h (F) que se comenzaron a observar cambios como neuronas con núcleo condensado.

8.11. El daño secundario neuronal posterior a un TCE en la subregiones hipocampales CA2/3 no presenta variaciones diurnas

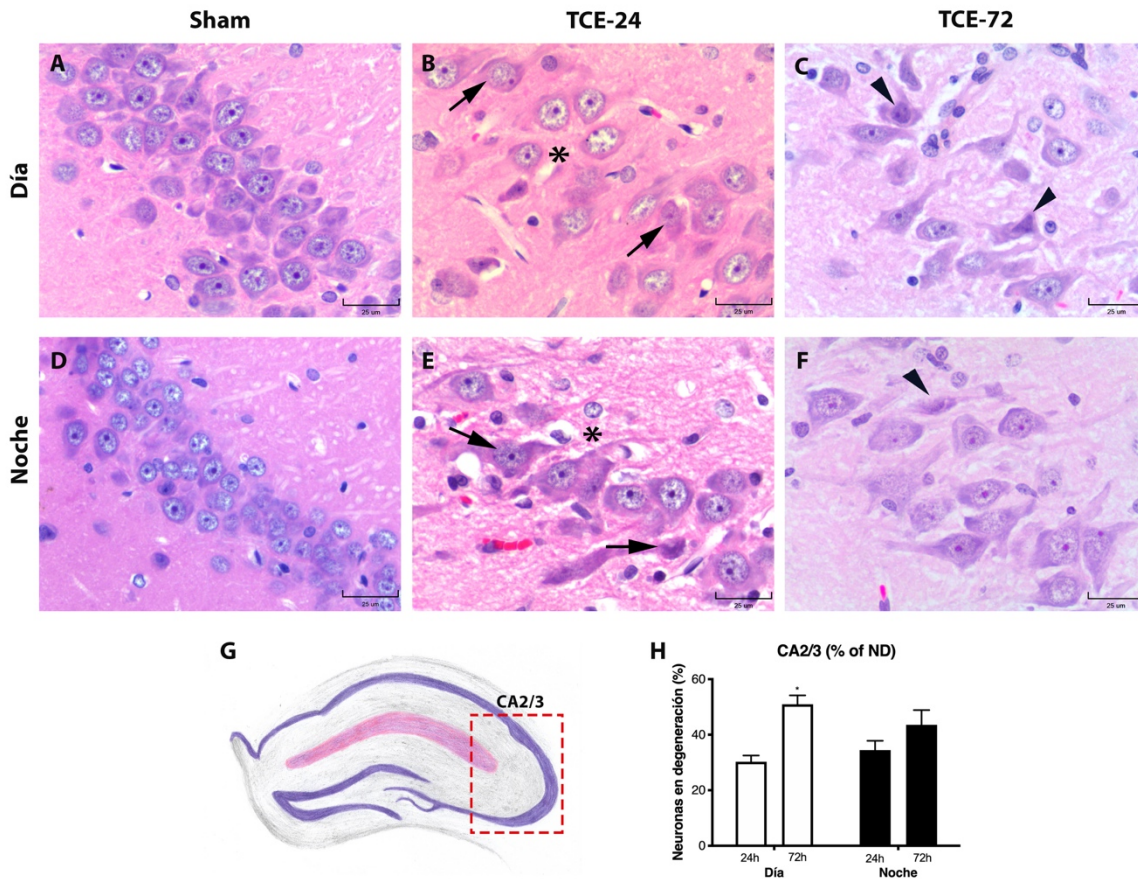


Figura 24. Histopatología de las subregiones de hipocampo CA2/3 que no mostraron variación diurna en la extensión del daño secundario posterior a un TCE. Subregión hipocampal CA2/3 en el grupo de Día (A-C) y en el grupo de Noche D-F); diagramas de la zona CA2/3 (G) dónde se realizó la determinación del porcentaje de ND. Cálculo del porcentaje de ND (H). n=4 cada columna. HyE. (H) Los datos están expresados en promedio \pm SEM. ANOVA de dos vías y prueba Tukey como post hoc. $*p < 0.05$; (barras, 25 μ m).

La descripción histopatológica de la subregión hipocampal de CA2/3 (**Figura 24**) mostró que las neuronas piramidales presentaron cambios similares a las 24 h después del TCE en los grupos de Día (B) y de Noche (F), tales como: incremento de la basofilia citoplásmica neuronal (flecha) y el tamaño del soma, con neuritas visibles, alargadas y pérdida de la densidad del neuropilo (asterisco). Estos cambios se mantuvieron incluso a las 72 h después del TCE en el grupo de Día (C) con la

adición de la presencia de ND (punta de flecha). Sin embargo, en el grupo nocturno (G), se observa la morfología neuronal bien conservada.

Respecto al porcentaje de ND en el hipocampo CA2/3 (H) encontramos influencia del tiempo (24 y 72) ($F_{1,8} = 16.38$, $p = 0.0037$) que fue considerablemente alto entre las 24 y 72 h después del TCE en el grupo de Día ($p = 0.0173$); sin embargo, este aumento no se observó en el grupo de la Noche ($p = 0.3599$). En cuanto a la influencia del grupo experimental (Día y Noche) ($F_{1,8} = 0.188$, $p = 0.675$), el análisis entre los grupos de Día y de Noche no mostró diferencias significativas a las 24 h ($p = 0.8516$) ni a las 72 h ($p = 0.5243$) después del trauma.

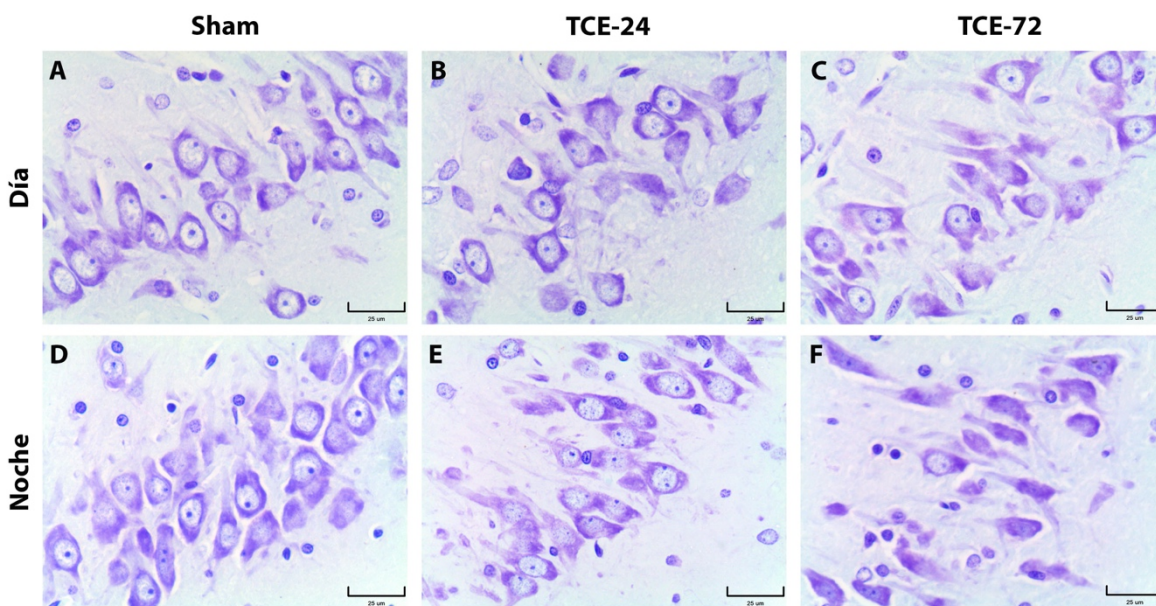


Figura 25. Histopatología con Nissl de la subregiones de hipocampo CA2/3. (objetivo 4×); (barras, 25 μm).

Finalmente, la tinción de Nissl (**Figura 25**) mostró resultados similares a los descritos con la técnica de HyE, tanto en el grupo con inducción de TCE durante el Día como en la Noche, se encontró que la región de CA2/3 presenta las mismas características histopatológicas tanto a las 24 como a las 72 h después del trauma.

8.12. El daño en la sustancia blanca presentó variaciones histopatológicas dependiendo de la hora del TCE.

Con el fin de analizar la extensión del daño en la SB que se encontrara neuroanatómicamente cercana a la zona de daño primario, realizamos la descripción histopatológica del giro del cíngulo (CG) y cuerpo caloso (CC) en las muestras teñidas con la técnica de Klüver-Barrera (**Figura 26**) y posteriormente se realizó la evaluación con la escala de daño en SB.

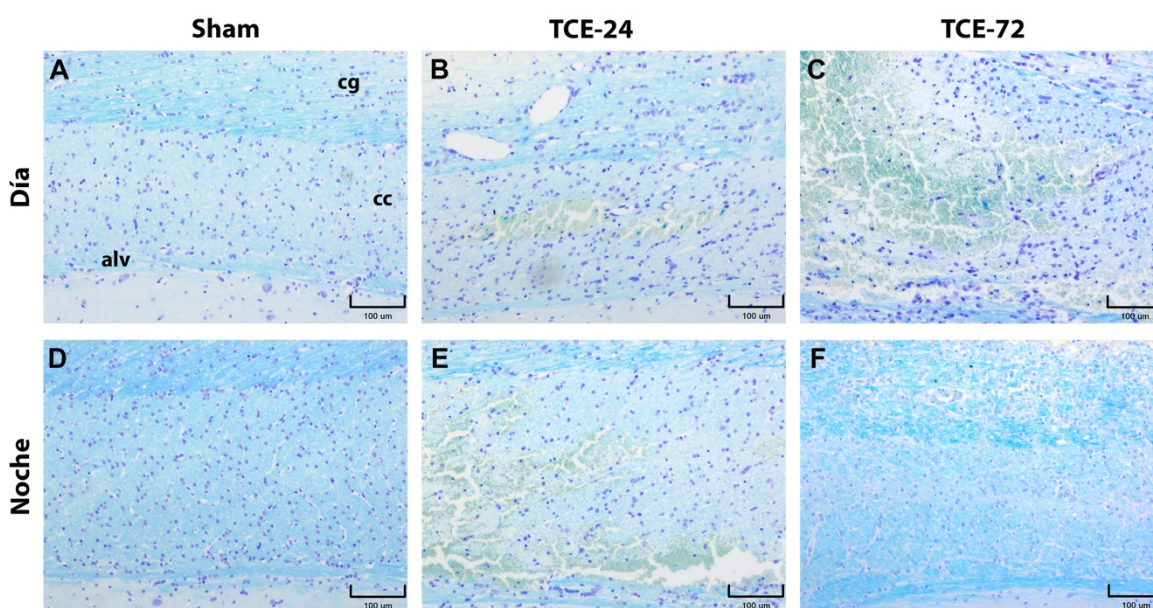


Figura 26. Estructuras de SB teñidas con Klüver Barrera. Fotomicrográficas del grupo de Día (A-C) y el grupo de Noche (D-E). Aparentemente el sangrado en la zona del CC es menor a las 24 h en el grupo de Día (B) que en el grupo de Noche. Sin embargo, a las 72h el sangrado aparenta ser mayor en el grupo de Día que en el de Noche. (10×). cg, giro del cíngulo; cc, cuerpo caloso; alv, alveus del hipocampo. (Barras, 100 µm).

La primera zona en analizarse fue GC (**Figura 27**), en la cual la descripción histopatológica mostró en el grupo de Día, que a las 24 h después del TCE (B), la disposición de los oligodendrocitos fasciculares se perdía, y se observó un aumento considerable de la vasodilatación de la zona y un desarreglo de las fibras mielinizadas y una disminución en la intensidad de la tinción de la mielina. Esta

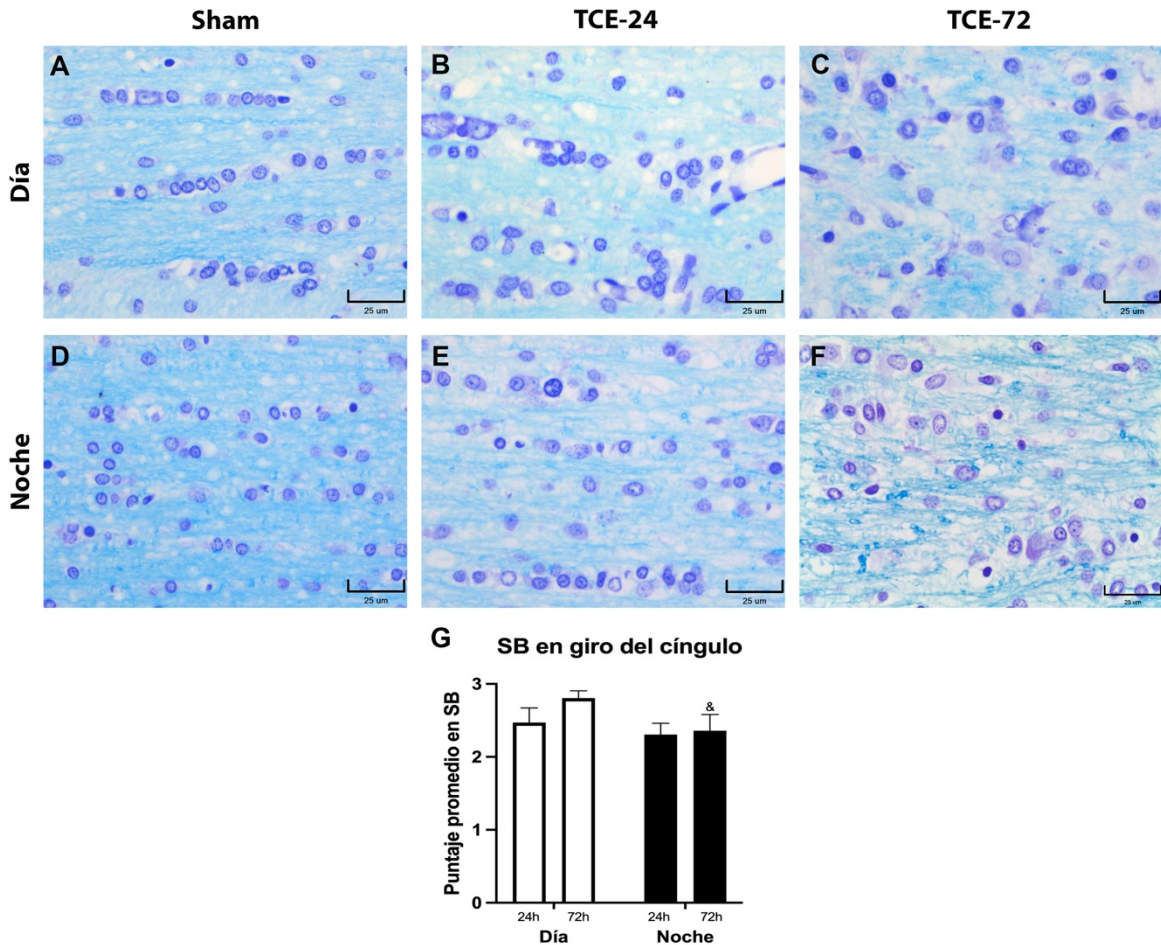


Figura 27. Sustancia Blanca Kluver Barrera (40x) Giro del Cíngulo. Los datos son expresados como promedio \pm SEM. Prueba de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney como *post hoc*, & $p < 0.05$ entre los grupos de Día y Noche. (Barras, 25 μ m)

alteración en las fibras se vió mayormente marcada a las 72 h después del trauma (C), donde la disposición de fibras prácticamente se perdió, y se vió acompañada de un aumento de la vacualización. Por el contrario, el grupo de Noche, presentó una mejor preservación de la SB, el encontrar que a las 24 h después del trauma (E), la presencia de oligodendrocitos fasciculares se mantenía y prácticamente no mostraba datos de vasodilatación, aunque si una ligera disminución en la intensidad de la tinción de la mielina. Posteriormente, a las 72 h después del TCE (F), se comenzó a observar un desarreglo en la disposición de las fibras y un aumento en la vacualización. El análisis de la escala de daño en SB (G) no mostró diferencias significativas entre las 24 y 72 h después del TCE en el grupo de Día ($p = 0.1500$)

ni en el grupo de Noche ($p = 0.3000$). Al comparar las 24 h del grupo de Día con el grupo de Noche, no encontramos diferencias significativas ($p = 0.2000$), pero al comparar las 72 h pos-TCE hubo una diferencia significativa ($p = 0.0500$), presentando una menor puntuación el grupo de Noche.

Por otro lado, la descripción histopatológica del CC (**Figura 28**) mostró que en el grupo de Día, a las 24 h después del TCE (B) hay una marcada vasodilatación, junto con una pérdida en la intensidad de la tinción y un evidente desarreglo en la disposición de los oligodendrocitos y de las fibras. A las 72 h (C), estos cambios se

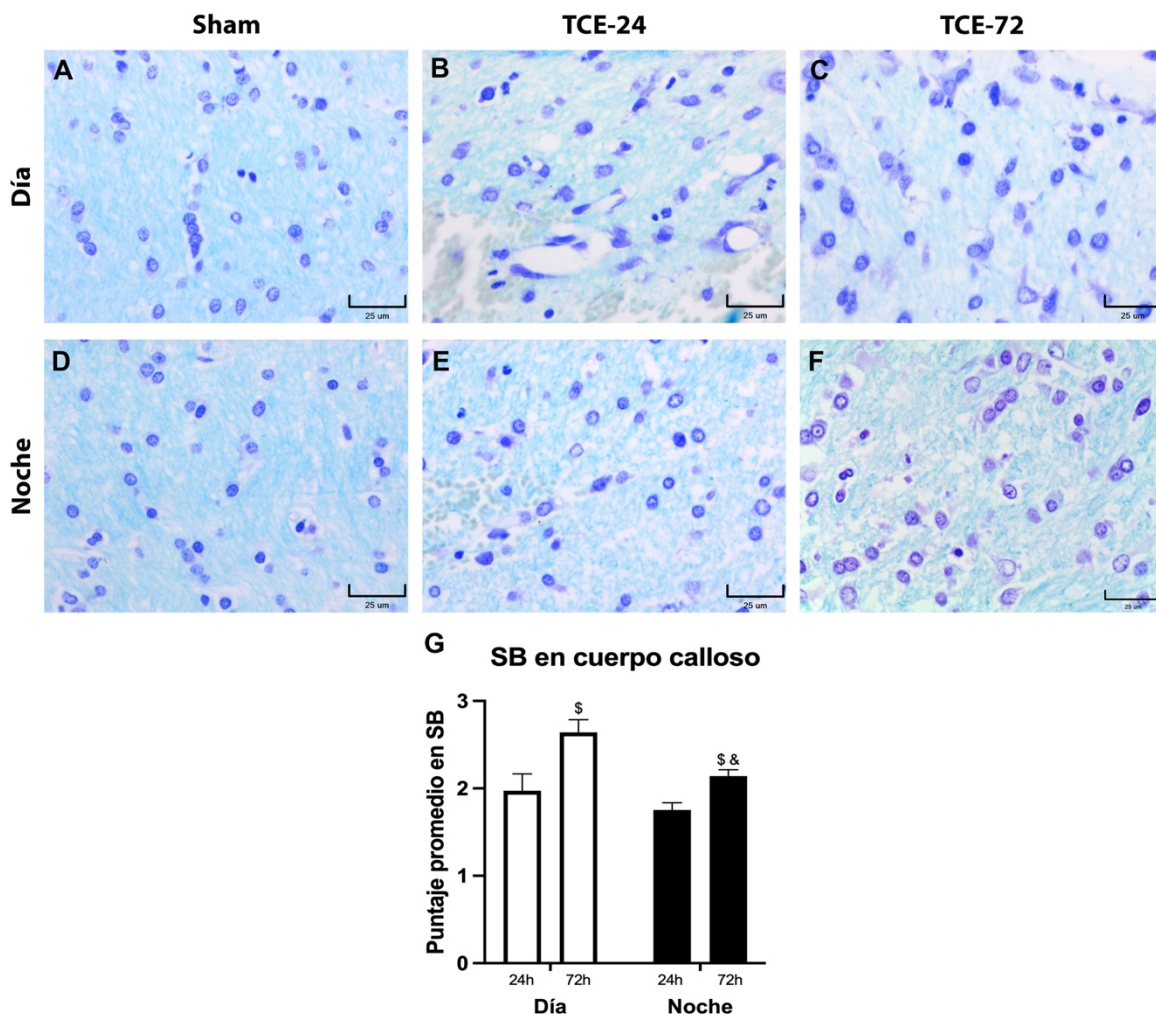


Figura 28. Análisis de la sustancia blanca de Cuerpo Calloso con Kluver Barrera (40x). Los datos son expresados como promedio \pm SEM. Prueba de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney como *post hoc*, & $p < 0.05$ entre los grupos de Día y Noche; \$ $p < 0.05$ entre 24 y 72 h. (Barras, 25 μ m).

acentuaron más, exceptuando la vasodilatación que no fue tan evidente. En cambio, el grupo de la Noche, a las 24 h después del trauma (D), aunque presentó un ligero desarreglo de las fibras la disposición de los oligodendrocitos se mostró más preservada, aunque fue notable un aumento en la vacuolización; a las 72 h después del TCE, el tejido de mostró mucho más preservado y con oligodendrocitos que se aprecian con una disposición fascicular, similar a lo observado en su grupo Sham (D).

Finalmente, el análisis de la escala de daño en SB (**Figura 28G**) evidenció diferencias significativas entre las 24 y 72 h después del TCE en el grupo de Día ($p = 0.0500$), obteniendo un mayor puntaje de daño a las 72h, lo mismo que para el grupo de Noche ($p = 0.0500$). Sin embargo, la comparación de las 24 h del grupo de Día con el grupo de Noche, no hubo diferencias significativas ($p = 0.3500$), pero al comparar las 72 h pos-TCE hubo, encontramos una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0500$), presentando una menor puntuación el grupo con TCE de Noche.

8.13. Análisis morfológico de la respuesta de la microglía dependiendo de la hora de inducción del TCE.

Con el fin de determinar la respuesta de la microglía dependiendo de la hora de inducción del TCE, observamos y analizamos su morfología mediante la inmunohistoquímica con Iba-1+.

La primera área que se analizó fue la zona perilesional a la zona de daño primario (corteza motora [M1]) (**Figura 29**). Respecto a la longitud de ramificación (G) no encontramos influencia de la hora del día ($F_{1,12} = 0.557$, $p = 0.4698$) y no hubo diferencias morfológicas entre el grupo Sham de Día en comparación con el grupo de Noche ($p = 0.5419$). Sin embargo, al analizar de la influencia del tiempo posterior al TCE ($F_{2,12} = 10.36$, $p = 0.0024$), nuestro análisis *post hoc*, sólo mostró una

diferencia significativa en el grupo de la Noche, entre el Sham y las 72 h después del TCE ($p = 0.0045$).

En cuanto al análisis de la ramificación (H), sorprendentemente encontramos una gran influencia de la hora del día ($F_{1,12} = 24.64$, $p = 0.0003$) ya que hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Sham de Día en comparación con el grupo de Noche ($p < 0.0001$). En este sentido, en nuestras fotomicrografías se hace evidente la gran ramificación que presenta la microglía principalmente en el grupo de Noche (D). Respecto a la influencia del tiempo posterior al TCE ($F_{2,12} = 41.11$, $p < 0.0001$) el grupo de Día, no presentó diferencias estadísticamente significativas ni

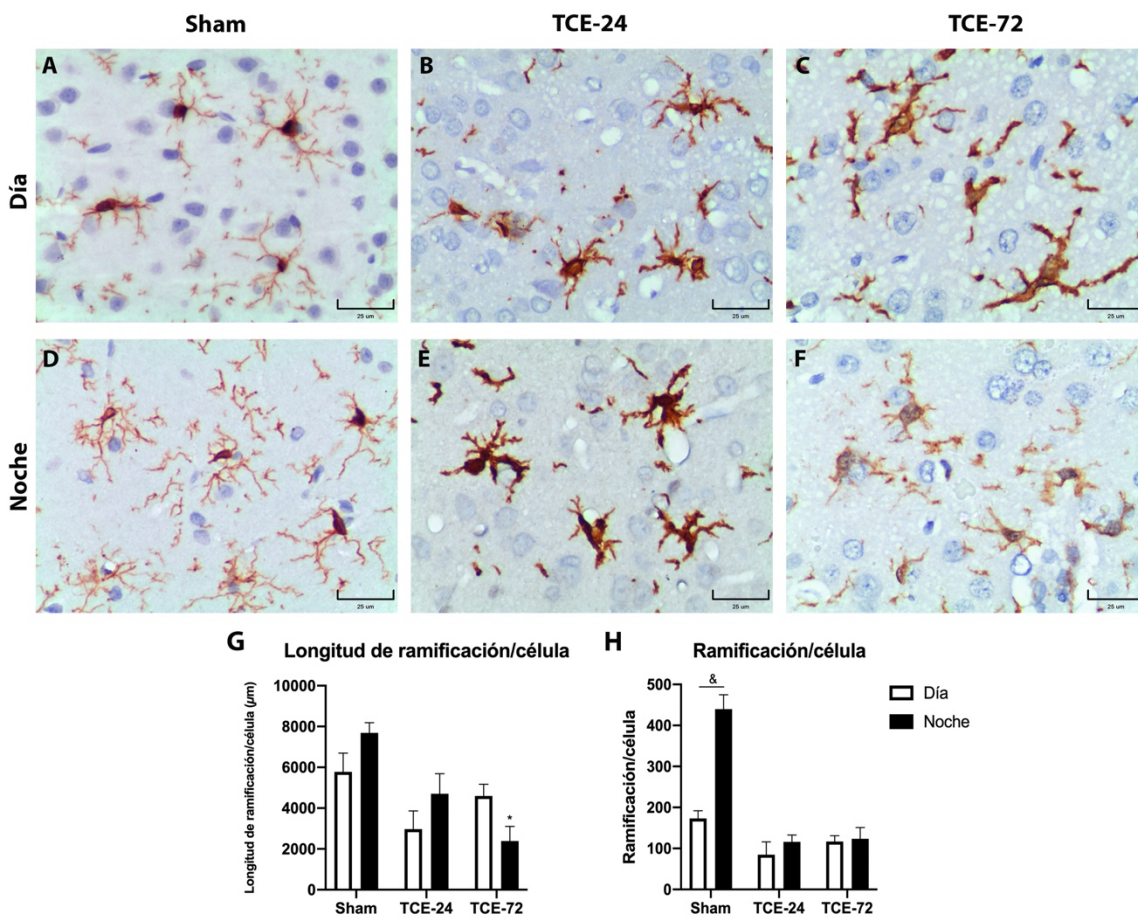


Figura 29. Fotomicrografías con inmunomarcaje para microglía (Iba-1+) en la zona perilesional (corteza motora [M1]) al TCE. $n=3$ cada columna. Los datos están expresados en promedio \pm SEM. ANOVA de dos vías y prueba Tukey como *post hoc*. * $p < 0.05$ entre Sham y TCE; & $p < 0.05$ entre Día y Noche. (Barras, 25 μ m).

a las 24 h ($p = 0.2017$), ni a las 72 h posteriores al trauma ($p = 0.6189$). Por el contrario, nuestro grupo de Noche, resultó con diferencias significativas entre el grupo Sham y las 24 h ($p < 0.0001$) y las 72 h después del TCE ($p < 0.0001$).

Después, realizamos el análisis de toda la zona de daño secundario (hipocampo) (**Figura 30**). Respecto a la longitud de la ramificación de la microglía (G) no encontramos influencia de la hora en la que fue inducido el trauma ($F_{1,12} = 0.0009$, $p = 0.976$) ni del tiempo posterior al TCE ($F_{2,12} = 0.061$, $p = 0.940$). Sin embargo, aunque la ramificación mostró influencia de la hora de inducción del TCE ($F_{1,12} = 7.341$, $p = 0.0190$), el análisis post hoc, no mostró diferencias significativas particulares. Por otro lado, encontramos influencia del tiempo posterior al TCE ($F_{2,12} = 23.19$, $p < 0.0001$) con diferencias significativas en el grupo de Día, a las 24 h (p

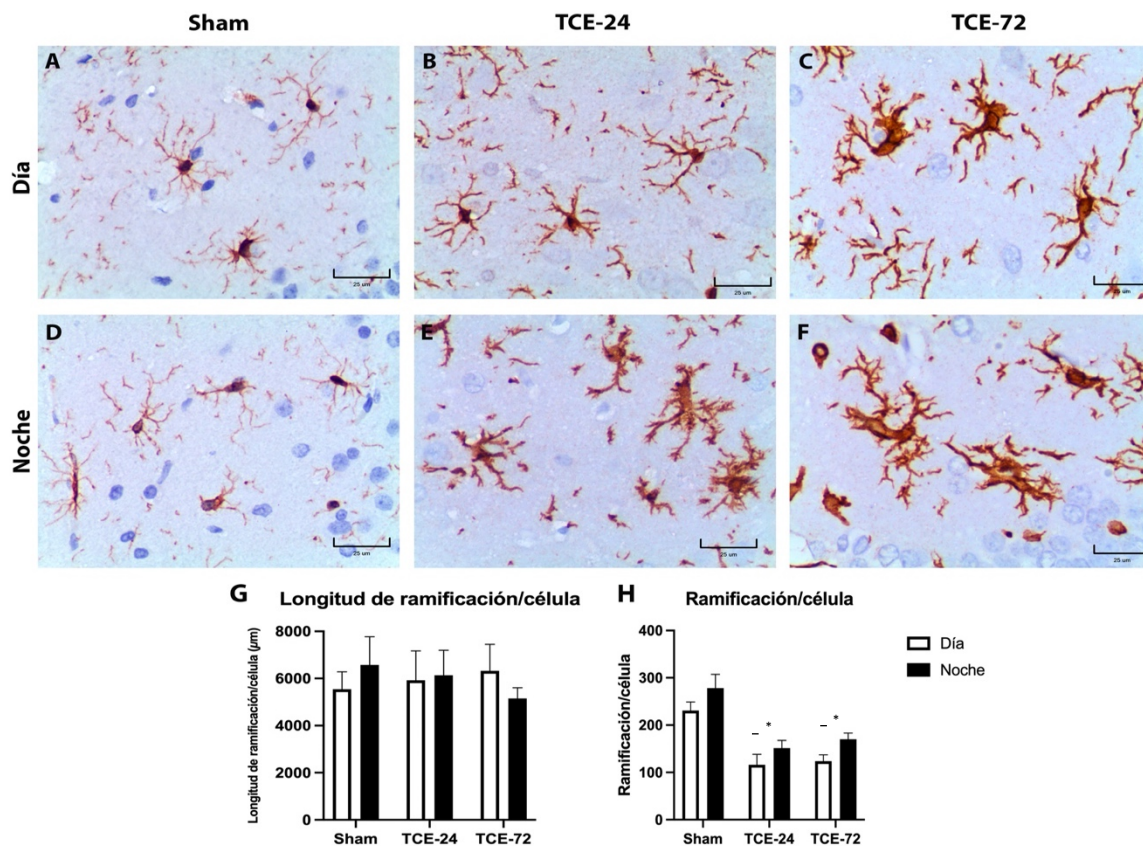


Figura 30. Fotomicrografías con inmunomarcaje para microglía (Iba-1+) en la zona de daño secundario (hipocampo) al TCE. n=3 cada columna. Los datos están expresados en promedio \pm SEM. ANOVA de dos vías y prueba Tukey como *post hoc*. * $p < 0.05$ entre Sham y TCE. (Barras, 25 μ m).

= 0.128) y a las 72 h ($p = 0.0206$) después del trauma; y en el grupo de Noche a las 24 h ($p = 0.0061$) y a las 72 h ($p = 0.0190$) después del trauma, todos en comparación con su respectivo grupo Sham.

8.14. Descripción morfológica de la respuesta respuesta astrocitaria dependiendo de la hora de inducción del TCE.

Con el objetivo de determinar la reactividad astrocitaria posterior a la inducción del TCE analizamos primeramente la zona perilesional al daño primario (corteza motora [M1]) (**Figura 31**) en donde encontramos una mayor astrogliosis en el grupo de Día a las 24 h después del trauma (B), caracterizada por un aumento en la intensidad de la marca del anticuerpo (no medido) y del tamaño de las células al compararlo con su grupo Sham. Este aumento en la reactividad se mantuvo a las 72 h después del trauma (C). El grupo de Noche presentó estos aumentos en la reactividad hasta las 72 h después del TCE (F).

Por otro lado, el análisis de la zona de daño secundario (hipocampo) (**Figura 32**), mostró una diferencia en la intensidad del marcaje (no medido) entre el grupo Sham del Día y el grupo de Noche. Al observar la respuesta entre ambos grupos a las 24 h, presentan aumento en la reactividad astrocitaria, pero a las 72 h, apreciamos un mayor aumento en la intensidad del inmunomarcaje en el grupo con TCE de Día en comparación con el de Noche.

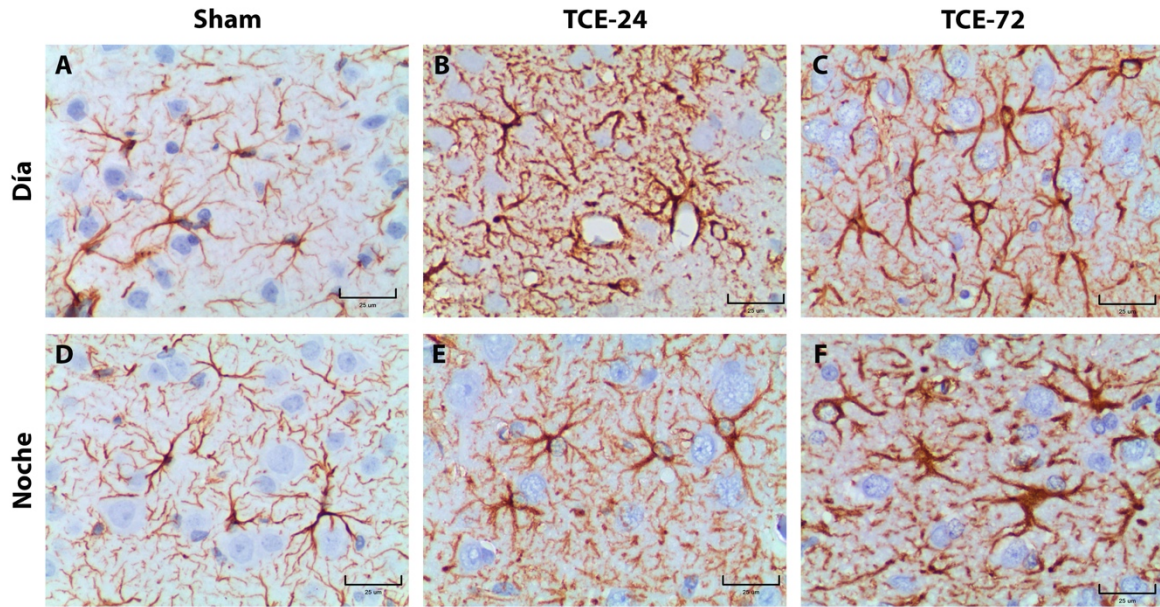


Figura 31. Inmunomarcaje de la respuesta astrocitaria (GFAP+) en la zona perilesional (corteza motora [M1]) al TCE. Se muestran el grupo de Día (A-C) y el grupo de Noche (D-F). n=3 cada columna. (Barras, 25 μ m).

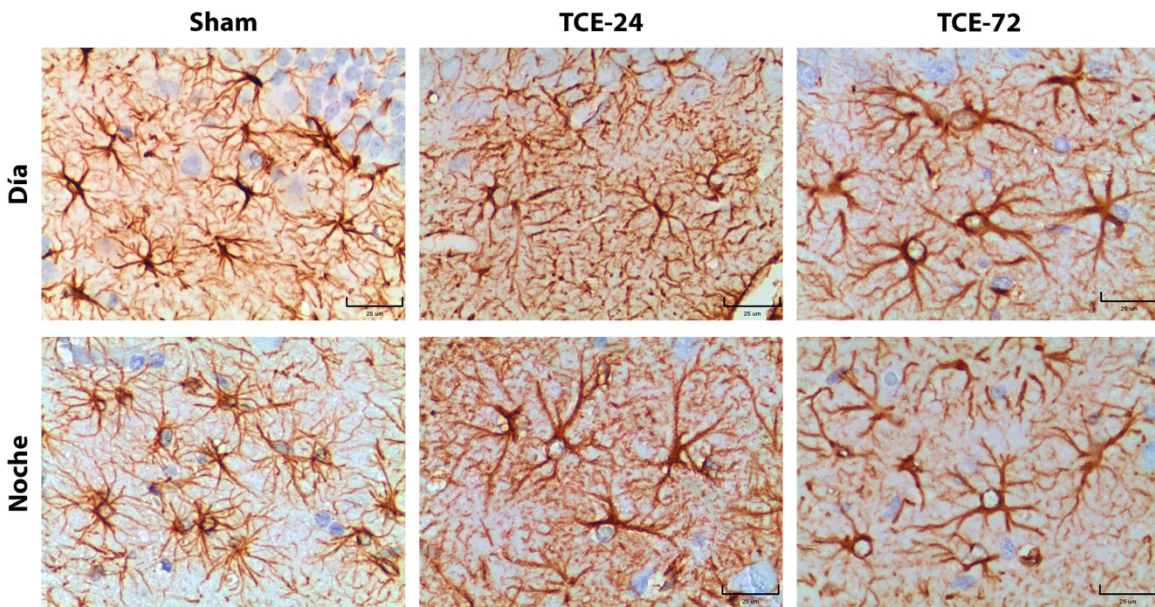


Figura 32. Inmunomarcaje de la respuesta astrocitaria (GFAP+) en la zona de daño secundario (hipocampo) al TCE. Se muestran el grupo de Día (A-C) y el grupo de Noche (D-F). n=3 cada columna. n=3 cada columna. (Barras, 25 μ m).

8.15. Cuantificación de la IL-1 β en la zona de daño secundario dependiendo de la hora de inducción del TCE.

Finalmente, con el objetivo de determinar el microambiente pro-inflamatorio en la zona de daño secundario, medimos la cantidad de IL-1 β en todo el hipocampo ipsilateral al TCE (**Figura 33**). Nuestros resultados mostraron que existe una influencia del tiempo (24 y 72) ($F_{2,14} = 7.097, p = 0.0074$) y el análisis *post hoc* resaltó una diferencia significativa en el grupo de Día, entre el Sham y las 72 h pos-TCE ($p = 0.0146$). Sin embargo, en el grupo de la Noche, no hubo diferencias entre el Sham y las 24 h ($p = 0.9431$) y las 72 h ($p = 0.7013$) posteriores al trauma. Finalmente, encontramos influencia del grupo experimental (Día y Noche) ($F_{1,14} = 22.14, p = 0.0003$) ya que al compararlos a las 24 h después del trauma, no hubo diferencias significativas ($p = 0.3081$), pero si encontramos una diferencia estadísticamente significativa a las 72 h posteriores al TCE ($p = 0.0131$).

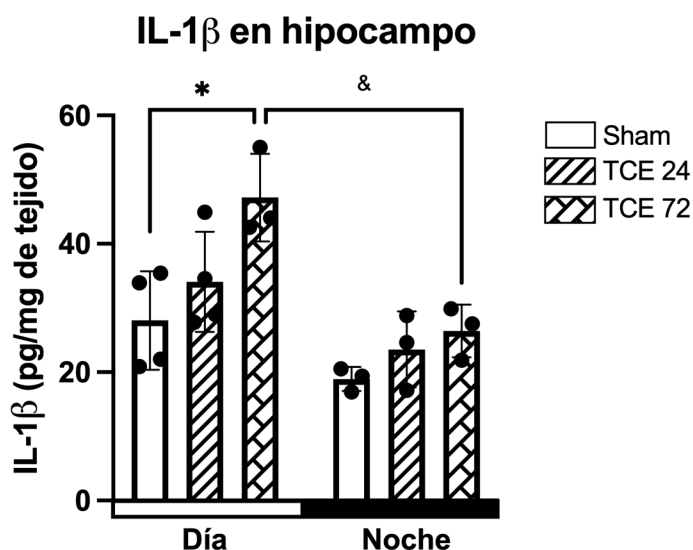


Figura 33. Cambios en la concentración de IL-1 β en el hipocampo ipsilateral al TCE. Nótese la variación en la concentración basal entre el día y la noche. Posterior al trauma el grupo de Día presenta una mayor cantidad de proteína en comparación con el grupo de la Noche. Los datos están expresados en promedio \pm SEM. ANOVA de dos vías y prueba Tukey como *post hoc*. * $p < 0.05$ entre Sham y TCE; & $p < 0.05$ entre Día y Noche.

9. DISCUSIÓN

La variación diurna en las variables fisiológicas de un organismo parecen determinar la respuesta a eventos ambientales, por ejemplo, una enfermedad o una lesión. Sin embargo, a pesar de la relevancia clínica, existe una investigación limitada sobre cómo estas variaciones diurnas determinan el grado de lesión y en específico posterior a un TCE. En este trabajo, mostramos que los parámetros generales de salud y los puntajes en tres pruebas neuroconductuales diferentes varían según la fase del ciclo luz–oscuridad en el que ocurrió el TCE. Además, estos cambios se relacionaron con el daño histopatológico en áreas específicas del cerebro y con una diferencia en la activación de las células de la microglía, el macrófago residente del SNC.

9.1. Cambios en parámetros generales de salud

Posterior a un TCE, una serie de eventos ocurren de forma local y en varios sistemas, tanto a nivel conductual como cognitivo. Estos eventos afectan el estado general del organismo porque pueden ocasionar pérdida del apetito, por lo que el organismo utiliza las reservas disponibles y, por lo tanto, su uso puede conducir a una pérdida de peso (Herrera-Martínez, 2011). En un estudio previo en ratas y utilizando un modelo por percusión líquida, se demostró una disminución significativa en la ingesta de alimentos y el peso corporal 10 días después de la lesión; sin embargo, la hora del trauma no se consideró en el trabajo (Moinard et al., 2005).

Nuestros resultados indicaron una disminución en la ingesta de alimentos sólo a las 24 h en ratas con inducción del TCE en la noche, y hasta 72 h después del trauma en ratas con inducción del TCE durante el día, además, las ratas con TCE durante la noche tuvieron menor pérdida de peso, lo que podría ser indicativo de la variación diurna de las respuestas neuroprotectoras del organismo. Esta pérdida de peso se ha asociado con un aumento en la glucólisis (estado hiper-glucolítico) en las primeras 24 h después del trauma, durante el cual, las grasas almacenadas se

convierten en la principal fuente de energía y las proteínas se conservan hasta el final del proceso (G. A. Brooks & Martin, 2015). Sin embargo, informes en pacientes críticos han descrito que numerosos procesos metabólicos podrían combinarse para inducir un estado hipermetabólico caracterizado por un marcado balance negativo de nitrógeno; además, la tasa de pérdida de masa magra es 2–3 veces mayor que durante la inanición y la lipólisis disminuye a medida que se desarrolla la intolerancia a la glucosa, lo que aumenta los niveles de insulina (Burke & Mathews, 1979; Dabrowski & Rombeau, 2000). Nuestros resultados sugieren que este estado hipermetabólico es más severo en los animales en los que se indujo el TCE durante el día.

9.2. Alteraciones neuroconductuales

Las corteza motora primaria [M1] es una región neuroanatómica ubicada en el lóbulo frontal y que se define y caracteriza por: a) una combinación de movimientos evocados por microestimulación de bajo umbral; b) proyecciones a las regiones motoras de la médula espinal contralateral; c) falta de la capa granular IV; y d) aferencias de los núcleos talámicos ventrobasales (Peters et al., 2017). Esta región junto con sus áreas asociadas, median la planificación y el inicio de complejas secuencias temporales de movimientos voluntarios (Purves et al., 2016).

Diversos estudios han demostrado que los déficits motores después de un TCE pueden ocurrir tanto por lesiones focales como difusas (Crane et al., 2012; Hehar et al., 2015; Lindner et al., 1998). Los resultados de nuestro estudio mostraron fallas en las habilidades motoras de las ratas con TCE, evaluadas con una escala neuroconductual de 21 puntos modificada (Hunter et al., 2000), en el que se evaluaron aspectos motores, percepción especial y reflejos, así como con la prueba de cilindro, que evalúa el daño de la corteza motora asociada principalmente con el control de miembros anteriores (Roome & Vanderluit, 2015) y finalmente con la prueba de caminata en barra que evalúa actividad motora fina (Hausser et al., 2018). De forma interesante, se encontraron diferencias significativas en los déficits motores entre los grupos de Día y de Noche a las 24 y 72 h después del TCE.

El análisis individual de los parámetros que conforman la escala neuroconductual de 21 puntos mostró que algunos de ellos mejoraron con el tiempo (24 h vs. 72 h), independientemente de la fase del ciclo luz – oscuridad en que indujimos el trauma, como la colocación de las patas, barra horizontal, plataforma inclinada, rotación y el alcance visual de patas delanteras. Por otro lado, aunque hubo parámetros cuyos puntajes disminuyeron, como la circulación, la motilidad y las condiciones generales, estas diferencias no fueron significativas.

Consideramos que estos cambios pudieran estar relacionados con el DAD generado después de una lesión cerebral traumática (Mu et al., 2019) ya que en trabajos previos se ha reportado que la pérdida de cuerpos neuronales (la cuál observamos en este trabajo) está asociada con la atrofia de la sustancia blanca, secundaria al DAD (Armstrong et al., 2016) en la que uno de sus cambios relevantes es la pérdida de mielina (Mu et al., 2019) (evaluada en este trabajo mediante la tinción de Kluver Barrera). Por otro lado, la variación diurna en los parámetros según el momento en que se indujo la lesión puede estar relacionada con cambios en neurotransmisores como el GABA, por ejemplo, algunos estudios han demostrado una variación diurna de las sinapsis inhibitorias ya que se ha observado que éstas van aumentando gradualmente en la fase activa (nocturna) en la corteza somatosensorial del ratón (Jasinska et al., 2015; Jasińska et al., 2014).

Finalmente, el reflejo de corrección y el reflejo contralateral no se vieron afectados; el daño causado en nuestro modelo de TCE fue en la zona M1, un área que no emite los comandos superiores que afectan estos reflejos. Los parámetros correspondientes a los reflejos son difíciles de cambiar ya que, como sabemos, la integración final se produce en la médula espinal, y en nuestro modelo, tanto los comandos superiores como los de la médula espinal en sí no se vieron afectados por trauma (Møller, AR., 2011), o por lo menos, al tiempo máximo que fueron evaluados después del TCE (72 h) no presentaron alteraciones.

La prueba de cilindro evalúa en la corteza sensori-motora el daño por el TCE. En este trabajo, la colocación de las patas o el predominio de una al tocar la pared del cilindro es una buena medida del daño a la corteza sensorimotora de la extremidad anterior y ayuda a detectar los déficits motores. Además, nuestros resultados del análisis de la asimetría de las extremidades anteriores mostraron diferencias entre los grupos de Día y Noche, cuando se evaluaron a las 24h y 72h después del TCE, lo que indica déficits conductuales más finos y consistentes (Farr & Whishaw, 2002; Tennant et al., 2010). La escala neuroconductual de 21 puntos mostró una diferencia significativa entre los grupos sometidos a TCE durante el día en comparación con aquellos con inducción del trauma en la noche; además, hubo una diferencia significativa entre los grupos de día y noche evaluados a las 24 y 72 h después del TCE.

Durante un trauma, el daño puede transmitirse como un gradiente fronto – posterior a través del DAD, pero con una mayor tendencia al daño frontal (Eierud et al., 2014). Esto reduce el control cortical de las funciones motoras de orden superior (Rosenbaum & Lipton, 2012; Tsenter et al., 2008). Los resultados de nuestras pruebas neuroconductuales son consistentes con los reportados en pacientes humanos que tienen una marcha lenta, asimétrica, pasos más cortos y una influencia mediolateral más significativa (Ozolins et al., 2016). Además, algunos informes indican un equilibrio y alteraciones motoras sutiles después de una lesión traumática (Finnanger et al., 2013; Neumann et al., 2009). Sin embargo, el equilibrio es una función compleja que involucra aspectos tanto motores como sensoriales e inclusive el cerebelo podría estar involucrado. La interpretación de los resultados debe considerar el hecho de que las ratas usan dos pares de extremidades para caminar, lo que podría compensar el desequilibrio causado por el daño neuronal (Namdar et al., 2020).

9.3. Cambios histopatológicos

Encontramos cambios celulares que se evidenciaron tanto con la descripción histopatológica como con el conteo neuronal que mostraron un menor daño en ratas

sometidas a TCE durante la noche en comparación con las ratas con trauma en el día. El grupo de la noche mostró un menor daño tisular en la zona perilesional al TCE de la corteza motora, con un mayor conteo total de neuronas y una menor cantidad de ND las 72 h después del trauma comparado con el grupo de día. La cascada fisiopatológica después de un TCE es muy compleja (Giza & Hovda, 2014), sin embargo, nuestros resultados son consistentes con un trabajo previo de nuestro laboratorio en donde se reportó la variación de la expresión del receptor NMDA en la corteza motora a lo largo del día, encontrándose una mayor expresión durante las horas de luz, una menor expresión en las horas de oscuridad. Esto finalmente se relacionó con un mejor pronóstico cuando el TCE fue inducido durante las horas de noche (Estrada-Rojo et al., 2018).

Respecto a nuestros resultados encontramos diferencias entre las subregiones de la zona de daño secundario (hipocampo) en la cual la subregión CA3 presentaba un aumento igual del porcentaje de ND en los grupos de Día y de Noche. Estudios previos han establecido una mayor susceptibilidad de la región CA3 utilizando un modelo de TCE conocido como impacto cortical controlado (Anderson et al., 2005) y en modelos matemáticos (Mao et al., 2013) sugiriendo que podría deberse a un componente biomecánico tras un traumatismo. Consideramos que CA3 presenta especializaciones únicas y funcionales compuestas por entradas de fibras musgosas del GD y amplias fibras colaterales de axones entre las neuronas de CA3. Esto crea no sólo una red altamente interconectada sino también excitable, lo que podría hacerla especialmente susceptible, independientemente del momento del día en que se produzca la lesión.

9.4. Hallazgos morfológicos de la microglía

Al ser la morfología de la microglía una de sus características particulares para conocer su actividad fisiológica, decidimos evaluarla y relacionarla con los hallazgos neuroconductuales e histopatológicos. Nuestros resultados sugieren que la microglía presenta cambios en su morfología a lo largo del día, evidenciada por una mayor ramificación durante la noche en comparación con el día en corteza

cerebral en los grupos Sham. Estos resultados corroboran lo reportado previamente en microglía aislada de corteza de ratón en la que también encontraron una mayor ramificación durante la noche; sin embargo, esos datos se relacionaron con la expresión de proteínas del reloj CLOCK y del receptor purinérgico P2Y₁₂, además, estos experimentos se desarrollaron durante oscuridad constante, lo que sugiere una influencia de tipo circadiana (Hayashi, 2013).

Inicialmente consideramos que una variación fisiológica de la ramificación de la microglía a lo largo del día determinaría que al enfrentarla a un reto inmune como el TCE, pudiera condicionar una diferencia en su respuesta inmune entre los ciclos de luz – oscuridad y esto de forma secundaria verse reflejado en su morfología. Nuestros resultados sugieren que la morfología ante un reto inmune de esta célula varía o no, dependiendo de la fase del ciclo luz-oscuridad y de la región cerebral. En la zona de daño secundario (hipocampo) sí se presentaron diferencias en la ramificación dependiendo de la fase del ciclo, encontrándola más ramificada en la noche; sin embargo, estas diferencias no se presentaron en la zona perilesional al TCE. Las diferencias de la respuesta morfológica de la microglía entre corteza e hipocampo entre el día y la noche pudieran explicarse con las características particulares de cada región, por ejemplo, el hipocampo es una estructura con una gran vascularización e inmunoregulación (Leiter et al., 2016), por lo que las diferencias morfológicas de la microglía pudieran no presentarse tan marcadas en corteza debido a que aparentemente también es una región con una baja expresión de genes fagocíticos o activadores de la inmunidad en comparación con el hipocampo (Tan et al., 2020).

Finalmente, se ha reportado que la microglía residente en la corteza somato– sensorial presenta una menor ramificación de sus extensiones citoplásmicas durante las horas de luz (Hayashi, 2013), pero presenta procesos celulares y puntos de ramificación comparativamente más altos y más largos durante las horas de oscuridad (Takayama et al., 2016).

9.5. Análisis del microambiente inflamatorio en el tejido nervioso

De acuerdo con nuestros resultados, existen diferencias en la concentración de la proteína IL-1 β en hipocampo habiendo una mayor concentración en el Sham de Día en comparación con el grupo Sham de Noche. Posteriormente, al analizar la cantidad de los grupos con TCE, hallamos una concentración que resultó significativamente menor en el grupo de Noche en comparación con el de Día hasta las 72 h. De forma interesante, estos hallazgos son congruentes con trabajos reportados previamente en los que en microglía aislada de hipocampo se determinó una variación a lo largo del día en esta proteína, aunque cabe resaltar que el modelo utilizado fue un reto con lipopolisacárido (Fonken et al., 2015).

Por otro lado, como parte de la búsqueda bibliográfica de este proyecto, al comparar la respuesta inmune que presentan los macrófagos que denominamos periféricos (es decir, fuera del SNC), respecto a la respuesta en microglía, encontramos datos interesantes (**Figura 34**). Por ejemplo, una comparación general sobre las horas de mayor inducción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos periféricos resultó

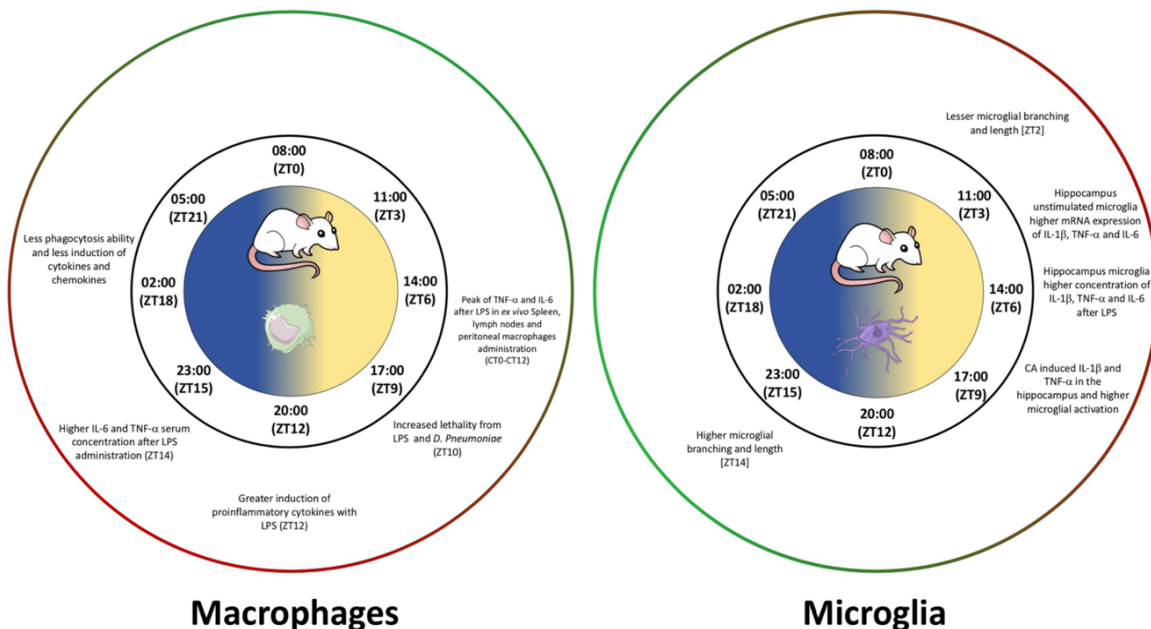


Figura 34. Comparación de la respuesta inmune entre macrófagos periféricos y microglía a lo largo del día. Diversos trabajos destacan la respuesta inmunitaria pro-inflamatoria de los macrófagos periféricos durante la transición luz-oscuridad o en la oscuridad, mientras que los estudios sobre la microglía muestran esta tendencia hacia las horas de luz (Martínez-Tapia et al., 2020).

que se encuentra principalmente en la transición de las horas de luz a las horas de oscuridad y, por el contrario, los datos reportados hasta el momento de la microglía ubican el pico máximo hacia la mitad de las horas de luz (Martínez-Tapia et al., 2020). Esta comparación necesita corroborarse con estudios posteriores, debido a que estas diferencias pudieran eventualmente tener relevancia clínica importante, por ejemplo, en la cronoterapia, un tipo de terapéutica que programa los tratamientos para que proporcionen la mayor ayuda y hagan el menor daño posible y en el caso del TCE, hasta ahora son pocos las aproximaciones que consideran tanto el momento en que sucede el TCE (Lee et al., 2021).

Consideramos que existen diversos factores que pudieran influenciar la diferencia de la respuesta inmune entre macrófagos periféricos y microglía a lo largo del día. Por ejemplo, se ha descrito que la BHE presenta variaciones en la permeabilidad que dependen tanto del sueño como de los ritmos circadianos (Cuddapah et al., 2019). También, se ha descrito que el sistema glinfático, una red perivascular dependiente de la glía, que cumple una función similar al sistema linfático en el cerebro, se activa principalmente durante el sueño (Iliff & Nedergaard, 2013; Jessen et al., 2015).

9.6. Asociación entre los hallazgos morfológicos e histopatológicos con los parámetros generales de salud y neuroconductuales

Finalmente, nuestros resultados demuestran que el grupo de ratas con inducción del TCE durante la Noche presentaron una menor pérdida de peso y mayor ingesta de alimento, una mejor puntuación en tres diferentes pruebas conductuales y un menor daño tisular caracterizado por un mayor conteo de NN, NC, menor cantidad de ND y una mejor preservación de las fibras mielínicas. También, tomando en cuenta la mayor ramificación de la microglía en la zona de daño secundario, que se asocia con menor actividad pro-inflamatoria en la noche por parte de la microglía y que indicaría de una menor activación, al igual que una aparente menor reactividad astrocitaria y una menor concentración de la IL-1 β , consideramos que existe una

alta asociación para concluir que la variación diurna ejerce un efecto neuroprotector en ratas con TCE durante la noche, respecto a las ratas con trauma en el Día.

10. CONCLUSIONES

En esta tesis hemos demostrado que la fase del ciclo luz – oscuridad influye en la respuesta motora, cuando se induce un modelo de TCE. Si el TCE se induce durante las horas de oscuridad, hay menor daño. Este mejor desempeño conductual lo pudimos asociar con una mejor preservación del tejido en la zona perilesional al daño primario (corteza motora [M1] y en ciertas regiones de la zona de daño secundario (hipocampo [CA1 y GD]) y una menor inducción de una citocina pro-inflamatoria (IL-1 β). Sin embargo, estos hallazgos no se asociaron con una menor respuesta de la microglía evaluada morfológicamente, por lo que el papel de esta célula pudiera presentar diferencias principalmente en ámbitos genéticos y moleculares.

La relevancia de este trabajo radica en que somos el primer grupo de investigación en describir estas diferencias de la variación diurna del daño secundario en un modelo de TCE, lo cual, desde el campo de la investigación básica, permite continuar y aportar conocimiento al estudio de una de las enfermedades desatendidas más importantes que tenemos en nuestro país.

Aún se requiere profundizar en el estudio de los mecanismos de daño y de neuroprotección desencadenados por un TCE, debido a que hasta la fecha son limitados los tratamientos que se les pueden brindar a los pacientes con cualquier tipo de trauma en la cabeza, por lo que es necesario enfatizar en encontrar nuevos o mejorar los limitados abordajes terapéuticos que se utilizan en el campo clínico.

11. PERSPECTIVAS

Si bien, el intentar llevar los hallazgos de este trabajo y aplicarlos al campo clínico pudiera no ser una tarea sencilla, principalmente por las diferencias que presenta el modelo murino en comparación con los humanos, consideramos que un primer acercamiento hacia la medicina traslacional, sería proponer un estudio epidemiológico de tipo descriptivo y comenzar a buscar asociaciones entre la hora del trauma, la gravedad y el pronóstico de los pacientes.

Por otra parte, el análisis de las células de la microglía implica un gran reto debido a que presentan una diversa gama de morfologías tanto en lesiones sutiles como en grandes daños (Karperien et al., 2013) por ejemplo, un estudio reciente ha descrito una gran heterogeneidad de perfiles microglía a lo largo de la vida de ratones (Hammond et al., 2019), por lo que el análisis morfológico de la microglía (extensión de la ramificación y ramificación) por sí solo podría ser limitado. Esto, porque estas células experimentan cambios en una serie de dominios a lo largo de múltiples escalas de tiempo (por ejemplo, el tamaño y la forma del soma, el volumen citoplásmico, la configuración de la membrana celular, la distribución de sus receptores, organización del citoesqueleto, diametro, tortuosidad, etc.) (Karperien et al., 2013). Un método cuantitativo complejo que podría ayudar a la interpretación del comportamiento de la microglía dependiendo de la hora del día en que se induce un trauma es el “análisis fractal”, el cuál considera parámetros multidimensionales que daría un resultado más profundo y nos permitiría una interpretación mucho más fina y detallada de los cambios que presenta la microglía (Fernández-Arjona et al., 2017; Karperien et al., 2013).

Así mismo, consideramos que convendría realizar un análisis más detallado de la respuesta del microambiente del tejido nervioso, y más en específico, discriminar la presencia de citocinas pro o anti-inflamatorias.

Por otro lado, el hecho de que se opte por una visión menos reduccionista del perfil M1/M2 de la microglía plantea a futuro el uso de otras técnicas que nos proporcionen una mayor información de la dinámica de la microglía posterior al TCE, por ejemplo, nuestro proyecto se vería beneficiado con la determinación de los receptores de la microglía mediante el uso de citometría de flujo para determinar su perfil inmune

12. REFERENCIAS

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41-53.
<https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Anderson, K. J., Miller, K. M., Fugaccia, I., & Scheff, S. W. (2005). Regional distribution of Fluoro-Jade B staining in the hippocampus following traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 193(1), 125-130.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.11.025>
- Armstrong, R. C., Mierzwa, A. J., Marion, C. M., & Sullivan, G. M. (2016). White matter involvement after TBI: Clues to axon and myelin repair capacity. *Experimental Neurology*, 275, 328-333. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.011>
- Beker, M. C., Caglayan, B., Yalcin, E., Caglayan, A. B., Turkseven, S., Gurel, B., Kelestemur, T., Sertel, E., Sahin, Z., Kutlu, S., Kilic, U., Baykal, A. T., & Kilic, E. (2018). Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. *Molecular Neurobiology*, 55(3), 2565-2576. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0524-4>
- Bhadra, U., Thakkar, N., Das, P., & Pal Bhadra, M. (2017). Evolution of circadian rhythms: From bacteria to human. *Sleep Medicine*, 35, 49-61.
<https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.04.008>
- Bramlett, H. M., & Dietrich, W. D. (2004). Pathophysiology of Cerebral Ischemia and Brain Trauma: Similarities and Differences. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 24(2), 133-150. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000111614.19196.04>
- Brooks, G. A., & Martin, N. A. (2015). Cerebral metabolism following traumatic brain injury: New discoveries with implications for treatment. *Frontiers in Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00408>
- Brooks, J. C., Shavelle, R. M., Strauss, D. J., Hammond, F. M., & Harrison-Felix, C. L. (2015). Long-Term Survival After Traumatic Brain Injury Part II: Life Expectancy. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 96(6), 1000-1005.
<https://doi.org/10.1016/j.apmr.2015.02.002>

- Brown, G. C., & Neher, J. J. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(4), 209-216. <https://doi.org/10.1038/nrn3710>
- Burda, J. E., Bernstein, A. M., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, *275*, 305-315. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.020>
- Burke, J. F., & Mathews, D. E. (1979). Glucose Requirements Following Burn Injury. *Ann. Surg.*, *10*.
- Butovsky, O., Madore, C., & Weiner, H. (2017). Microglial Biology and Physiology. En T. Ikezu & H. E. Gendelman (Eds.), *Neuroimmune Pharmacology* (pp. 167-199). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44022-4_13
- Capizzi, A., Woo, J., & Verduzco-Gutierrez, M. (2020). Traumatic Brain Injury. *Medical Clinics of North America*, *104*(2), 213-238. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.11.001>
- Carpentier, P. A., Begolka, W. S., Olson, J. K., Elhofy, A., Karpus, W. J., & Miller, S. D. (2005). Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*, *49*(3), 360-374. <https://doi.org/10.1002/glia.20117>
- Chen, T., Dai, S.-H., Jiang, Z.-Q., Luo, P., Jiang, X.-F., Fei, Z., Gui, S.-B., & Qi, Y.-L. (2017). The AMPAR Antagonist Perampanel Attenuates Traumatic Brain Injury Through Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Activity. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *37*(1), 43-52. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0341-8>
- Chen, Y., & Swanson, R. A. (2003). Astrocytes and Brain Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *23*(2), 137-149. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C>
- Cheng, G., Kong, R., Zhang, L., & Zhang, J. (2012). Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies: Mitochondria in traumatic brain injury. *British Journal of Pharmacology*, *167*(4), 699-719. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02025.x>
- Chin, L. M., Keyser, R. E., Dsurney, J., & Chan, L. (2015). Improved Cognitive Performance Following Aerobic Exercise Training in People With Traumatic Brain Injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, *96*(4), 754-759. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2014.11.009>

- Cornelius, C., Crupi, R., Calabrese, V., Graziano, A., Milone, P., Pennisi, G., Radak, Z., Calabrese, E. J., & Cuzzocrea, S. (2013). Traumatic Brain Injury: Oxidative Stress and Neuroprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, *19*(8), 836-853.
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4981>
- Corps, K. N., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2015). Inflammation and Neuroprotection in Traumatic Brain Injury. *JAMA Neurology*, *72*(3), 355.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.3558>
- Crane, A. T., Fink, K. D., & Smith, J. S. (2012). The effects of acute voluntary wheel running on recovery of function following medial frontal cortical contusions in rats. *Restorative Neurology and Neuroscience*, *30*(4), 325-333.
<https://doi.org/10.3233/RNN-2012-120232>
- Cruz-Haces, M., Tang, J., Acosta, G., Fernandez, J., & Shi, R. (2017). Pathological correlations between traumatic brain injury and chronic neurodegenerative diseases. *Translational Neurodegeneration*, *6*(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0088-2>
- Cuddapah, V. A., Zhang, S. L., & Sehgal, A. (2019). Regulation of the Blood–Brain Barrier by Circadian Rhythms and Sleep. *Trends in Neurosciences*, *42*(7), 500-510.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.05.001>
- Čulić, V. (2014). Chronobiological rhythms of acute cardiovascular events and underlying mechanisms. *International Journal of Cardiology*, *174*(2), 417-419.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.04.043>
- Dabrowski, G. P., & Rombeau, J. L. (2000). Practical nutritional management in the trauma intensive care unit. *Surgical Clinics of North America*, *80*(3), 921-932.
[https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(05\)70105-5](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(05)70105-5)
- Díaz de León Ponce, M. A., Basilio Olivares, A., Cruz Vega, F., & Briones Garduño, J. C. (2016). *Trauma. Un problema de salud en México* (Academia Nacional de Medicina de México (ANMM), Vol. 1-1). Intersistemas, S.A. de C.V.
- Dirnagl, U., Simon, R. P., & Hallenbeck, J. M. (2003). Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends in Neurosciences*, *26*(5), 248-254.
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00071-7](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00071-7)
- Eierud, C., Craddock, R. C., Fletcher, S., Aulakh, M., King-Casas, B., Kuehl, D., &

- LaConte, S. M. (2014). Neuroimaging after mild traumatic brain injury: Review and meta-analysis. *NeuroImage: Clinical*, 4, 283-294.
<https://doi.org/10.1016/j.nicl.2013.12.009>
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W.-T., Cohen-Salmon, M., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, 24(3), 312-325.
<https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
- Estrada-Rojo, F., Morales Gómez, J., Tabla Ramón, E., Solís Luna, B., Navarro Argüelles, H. A., Martínez Vargas, M., Pérez Arredondo, A., González Rivera, R., Rodríguez Salazar, L. E., & Navarro, L. (2012). Neuroprotección y traumatismo craneoencefálico. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 55(4), 14.
- Estrada-Rojo, F., Morales-Gomez, J., Coballase-Urrutia, E., Martinez-Vargas, M., & Navarro, L. (2018). Diurnal variation of NMDA receptor expression in the rat cerebral cortex is associated with traumatic brain injury damage. *BMC Research Notes*, 11(1), 150. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3258-0>
- Faden, A. I., & Stoica, B. (2007). Neuroprotection: Challenges and Opportunities. *Archives of Neurology*, 64(6), 794. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.6.794>
- Farr, T. D., & Wishaw, I. Q. (2002). Quantitative and Qualitative Impairments in Skilled Reaching in the Mouse (*Mus musculus*) After a Focal Motor Cortex Stroke. *Stroke*, 33(7), 1869-1875. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000020714.48349.4E>
- Faul, M., Xu, L., Wald, M. M., & Coronado, V. G. (2010). Traumatic Brain Injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations and Deaths 2002-2006. *Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control*, 74.
- Fernández-Arjona, M. del M., Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., & López-Ávalos, M. D. (2017). Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 235.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00235>

- Finnanger, T. G., Skandsen, T., Andersson, S., Lydersen, S., Vik, A., & Indredavik, M. (2013). Differentiated patterns of cognitive impairment 12 months after severe and moderate traumatic brain injury. *Brain Injury*, *27*(13-14), 1606-1616.
<https://doi.org/10.3109/02699052.2013.831127>
- Fonken, L. K., Frank, M. G., Kitt, M. M., Barrientos, R. M., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2015). Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock. *Brain, Behavior, and Immunity*, *45*, 171-179.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.11.009>
- Franco, R., & Fernández-Suárez, D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, *131*, 65-86.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.05.003>
- Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. (2012). Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, *65*, 3564. <https://doi.org/10.3791/3564>
- Garman, R. H. (2011). Histology of the Central Nervous System. *Toxicologic Pathology*, *39*(1), 22-35. <https://doi.org/10.1177/0192623310389621>
- Giza, C. C., & Hovda, D. A. (2014). The New Neurometabolic Cascade of Concussion: *Neurosurgery*, *75*, S24-S33. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000000505>
- Graham, N. S., & Sharp, D. J. (2019). Understanding neurodegeneration after traumatic brain injury: From mechanisms to clinical trials in dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *90*(11), 1221-1233. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317557>
- Hammond, T. R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., Walker, A. J., Gergits, F., Segel, M., Nemesh, J., Marsh, S. E., Saunders, A., Macosko, E., Ginhoux, F., Chen, J., Franklin, R. J. M., Piao, X., McCarroll, S. A., & Stevens, B. (2019). Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*, *50*(1), 253-271.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.004>
- Hausser, N., Johnson, K., Parsley, M. A., Guptarak, J., Spratt, H., & Sell, S. L. (2018). Detecting Behavioral Deficits in Rats After Traumatic Brain Injury. *Journal of Visualized Experiments*, *131*, 56044. <https://doi.org/10.3791/56044>
- Hayashi, Y. (2013). Diurnal Spatial Rearrangement of Microglial Processes through the

- Rhythmic Expression of P2Y₁₂ Receptors. *Journal of Neurological Disorders*, 01(02). <https://doi.org/10.4172/2329-6895.1000120>
- Hayter, E. A., Wehrens, S. M. T., Van Dongen, H. P. A., Stangherlin, A., Gaddameedhi, S., Crooks, E., Barron, N. J., Venetucci, L. A., Neill, J. S. O., Brown, T. M., Skene, D. J., Trafford, A. W., & Bechtold, D. A. (2021). Distinct circadian mechanisms govern cardiac rhythms and susceptibility to arrhythmia. *Nature Communications*, 12(1), 2472. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22788-8>
- Hehar, H., Yeates, K., Kolb, B., Esser, M. J., & Mychasiuk, R. (2015). Impulsivity and Concussion in Juvenile Rats: Examining Molecular and Structural Aspects of the Frontostriatal Pathway. *PLOS ONE*, 10(10), e0139842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139842>
- Herrera-Martínez, E. (2011). *Traumatismo craneoencefálico, fundamentos de patología, fisiopatología clínica, diagnóstico y tratamiento*. (1st ed., Vol. 1-1). Trillas.
- Hiebert, J. B., Shen, Q., Thimmesch, A. R., & Pierce, J. D. (2015). Traumatic Brain Injury and Mitochondrial Dysfunction. *The American Journal of the Medical Sciences*, 350(2), 132-138. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0000000000000506>
- Hunter, A. J., Hatcher, J., Virley, D., Nelson, P., Irving, E., Hadingham, S. J., & Parsons, A. A. (2000). Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology*, 39(5), 806-816. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(99\)00262-2](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00262-2)
- Iliff, J. J., & Nedergaard, M. (2013). Is There a Cerebral Lymphatic System? *Stroke*, 44(6, Supplement 1), S93-S95. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.678698>
- INEGI. (2019). *Características de las defunciones registradas en México durante 2018* (N.º 538; p. 65). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2019/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2019.pdf>
- Jain, K. K. (2019). *The Handbook of Neuroprotection*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9465-6>
- James, S. L., Theadom, A., Ellenbogen, R. G., Bannick, M. S., Montjoy-Venning, W., Lucchesi, L. R., Abbasi, N., Abdulkader, R., Abraha, H. N., Adsuar, J. C., Afarideh, M., Agrawal, S., Ahmadi, A., Ahmed, M. B., Aichour, A. N., Aichour, I., Aichour,

- M. T. E., Akinyemi, R. O., Akseer, N., ... Murray, C. J. L. (2019). Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, *18*(1), 56-87. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30415-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30415-0)
- Jasińska, M., Grzegorzczak, A., Jasek, E., Litwin, J. A., Kossut, M., Barbacka, G., & Pyza, E. (2014). Daily rhythm of synapse turnover in mouse somatosensory cortex. *Acta Neurobiol Exp*, *7*.
- Jasinska, M., Grzegorzczak, A., Woznicka, O., Jasek, E., Kossut, M., Barbacka-Surowiak, G., Litwin, J. A., & Pyza, E. (2015). Circadian rhythmicity of synapses in mouse somatosensory cortex. *European Journal of Neuroscience*, *42*(8), 2585-2594. <https://doi.org/10.1111/ejn.13045>
- Jassam, Y. N., Izzy, S., Whalen, M., McGavern, D. B., & El Khoury, J. (2017). Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron*, *95*(6), 1246-1265. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.010>
- Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochemical Research*, *40*(12), 2583-2599. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6>
- Karperien, A., Ahammer, H., & Jelinek, H. F. (2013). Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00003>
- Karve, I. P., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2016). The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury: Neuroinflammation and TBI. *British Journal of Pharmacology*, *173*(4), 692-702. <https://doi.org/10.1111/bph.13125>
- Kaur, P., & Sharma, S. (2018). Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Current Neuropharmacology*, *16*(8), 1224-1238. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170613083606>
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, *91*(2), 461-553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, *77*(1), 10-18.

- <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Kierdorf, K., & Prinz, M. (2017). Microglia in steady state. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(9), 3201-3209. <https://doi.org/10.1172/JCI90602>
- Kim, H. J., Fillmore, H. L., Reeves, T. M., & Phillips, L. L. (2005). Elevation of hippocampal MMP-3 expression and activity during trauma-induced synaptogenesis. *Experimental Neurology*, *192*(1), 60-72. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.10.014>
- Kim, J., Min, K.-J., Seol, W., Jou, I., & Joe, E. (2010). Astrocytes in injury states rapidly produce anti-inflammatory factors and attenuate microglial inflammatory responses: Anti-inflammatory roles of astrocytes in injury states. *Journal of Neurochemistry*, *115*(5), 1161-1171. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07004.x>
- Klerman, E. B. (2005). Clinical Aspects of Human Circadian Rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, *20*(4), 375-386. <https://doi.org/10.1177/0748730405278353>
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, *39*(1), 151-170. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-w](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-w)
- Lee, Y., Field, J. M., & Sehgal, A. (2021). Circadian Rhythms, Disease and Chronotherapy. *Journal of Biological Rhythms*, 074873042110443. <https://doi.org/10.1177/07487304211044301>
- Leiter, O., Kempermann, G., & Walker, T. L. (2016). A Common Language: How Neuroimmunological Cross Talk Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis. *Stem Cells International*, *2016*, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2016/1681590>
- Leker, R. R., & Shohami, E. (2002). Cerebral ischemia and trauma—different etiologies yet similar mechanisms: Neuroprotective opportunities. *Brain Research Reviews*, *39*(1), 55-73. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(02\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00157-1)
- Lewis, P., Korf, H. W., Kuffer, L., Groß, J. V., & Erren, T. C. (2018). Exercise time cues (zeitgebers) for human circadian systems can foster health and improve performance: A systematic review. *BMJ Open Sport & Exercise Medicine*, *4*(1), e000443. <https://doi.org/10.1136/bmjsem-2018-000443>
- Lindner, M. D., Plone, M. A., Cain, C. K., Frydel, B., Francis, J. M., Emerich, D. F., & Sutton, R. L. (1998). Dissociable Long-Term Cognitive Deficits after Frontal versus

- Sensorimotor Cortical Contusions. *Journal of Neurotrauma*, 15(3), 199-216.
<https://doi.org/10.1089/neu.1998.15.199>
- Liu, Q., He, S., Groysman, L., Shaked, D., Russin, J., Cen, S., & Mack, W. J. (2013). White Matter Injury Due to Experimental Chronic Cerebral Hypoperfusion Is Associated with C5 Deposition. *PLoS ONE*, 8(12), e84802.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084802>
- Liu, Y., Wang, R., Zhao, Z., Dong, W., Zhang, X., Chen, X., & Ma, L. (2017). Short-term caloric restriction exerts neuroprotective effects following mild traumatic brain injury by promoting autophagy and inhibiting astrocyte activation. *Behavioural Brain Research*, 331, 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.024>
- Livingston-Thomas, J. M., & Tasker, R. A. (2013). Animal models of post-ischemic forced use rehabilitation: Methods, considerations, and limitations. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 5(1), 2. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-5-2>
- Loane, D. J., & Faden, A. I. (2010). Neuroprotection for traumatic brain injury: Translational challenges and emerging therapeutic strategies. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(12), 596-604.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.09.005>
- Loane, D. J., & Kumar, A. (2016). Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Experimental Neurology*, 275, 316-327.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.08.018>
- Lyu, J., Jiang, X., Leak, R. K., Shi, Y., Hu, X., & Chen, J. (2020). Microglial Responses to Brain Injury and Disease: Functional Diversity and New Opportunities. *Translational Stroke Research*. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00857-2>
- Maas, A. I., Stocchetti, N., & Bullock, R. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *The Lancet Neurology*, 7(8), 728-741. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70164-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70164-9)
- Madathil, S. K., Carlson, S. W., Brelsfoard, J. M., Ye, P., D'Ercole, A. J., & Saatman, K. E. (2013). Astrocyte-Specific Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-1 Protects Hippocampal Neurons and Reduces Behavioral Deficits following Traumatic Brain Injury in Mice. *PLoS ONE*, 8(6), e67204.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067204>

- Magno, A., Collodetti, M., Tenza-Ferrer, H., & Romano-Silva, M. A. (2019). Cylinder Test to Assess Sensory-motor Function in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Bio-protocol*, 9(16), e3337. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3337>
- Mao, H., Elkin, B. S., Genthikatti, V. V., Morrison, B., & Yang, K. H. (2013). Why Is CA3 More Vulnerable Than CA1 in Experimental Models of Controlled Cortical Impact-Induced Brain Injury? *Journal of Neurotrauma*, 30(17), 1521-1530. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2520>
- Martínez-Tapia, R. J., Chavarría, A., & Navarro, L. (2020). Differences in Diurnal Variation of Immune Responses in Microglia and Macrophages: Review and Perspectives. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 40(3), 301-309. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00736-x>
- Martinez-Vargas, M., Estrada Rojo, F., Tabla-Ramon, E., Navarro-Argüelles, H., Ortiz-Lailzon, N., Hernández-Chávez, A., Solis, B., Martínez Tapia, R., Perez Arredondo, A., Morales-Gomez, J., Gonzalez-Rivera, R., Nava-Talavera, K., & Navarro, L. (2012). Sleep deprivation has a neuroprotective role in a traumatic brain injury of the rat. *Neuroscience Letters*, 529(2), 118-122. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.09.037>
- Martinez-Vargas, M., Morales-Gomez, J., Gonzalez-Rivera, R., Hernandez-Enriquez, C., Perez-Arredondo, A., Estrada-Rojo, F., & Navarro, L. (2013). Does the Neuroprotective Role of Anandamide Display Diurnal Variations? *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), 23341-23355. <https://doi.org/10.3390/ijms141223341>
- Martinez-Vargas, M., Soto-Nuñez, M., Tabla-Ramon, E., Solis, B., Gonzalez-Rivera, R., Perez-Arredondo, A., Estrada-Rojo, F., Castell, A., Molina-Guarneros, J., & Navarro, L. (2014). Cystatin C Has a Dual Role in Post-Traumatic Brain Injury Recovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 5807-5820. <https://doi.org/10.3390/ijms15045807>
- Mckee, A. C., & Daneshvar, D. H. (2015). The neuropathology of traumatic brain injury. En *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 127, pp. 45-66). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52892-6.00004-0>
- Menon, D. K., Schwab, K., Wright, D. W., & Maas, A. I. (2010). Position Statement:

- Definition of Traumatic Brain Injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 91(11), 1637-1640. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2010.05.017>
- Miyamoto, E., Nakao, S., Tomimoto, H., Wakita, H., Yamada, M., Masuzawa, M., Takahira, K., Sakamoto, S., & Shingu, K. (2004). Ketamine attenuates hypoxia-induced neuronal damage in the caudoputamen in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Neuroscience Letters*, 354(1), 26-29. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.09.058>
- Moinard, C., Neveux, N., Royo, N., Genthon, C., Marchand-Verrecchia, C., Plotkine, M., & Cynober, L. (2005). Characterization of the alteration of nutritional state in brain injury induced by fluid percussion in rats. *Intensive Care Medicine*, 31(2), 281-288. <https://doi.org/10.1007/s00134-004-2489-9>
- Møller, AR. (2011). Anatomy and Physiology of Motor Systems. En *Intraoperative Neurophysiological Monitoring*. Humana Press.
- Morales-Gomez, J. J. (2013). *Papel del sistema canabinérgico en la variación diurna de la neuroprotección frente a un traumatismo craneoencefálico* [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mu, J., Li, M., Wang, T., Li, X., Bai, M., Zhang, G., & Kong, J. (2019). Myelin Damage in Diffuse Axonal Injury. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 217. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00217>
- Myer, D. J. (2006). Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain*, 129(10), 2761-2772. <https://doi.org/10.1093/brain/awl165>
- Namdar, I., Feldman, R., Glazer, S., Meningher, I., Shlobin, N. A., Rubovitch, V., Bikovski, L., Been, E., & Pick, C. G. (2020). Motor Effects of Minimal Traumatic Brain Injury in Mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, 70(3), 365-377. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01422-9>
- Neumann, M., Wang, Y., Kim, S., Hong, S. M., Jeng, L., Bilgen, M., & Liu, J. (2009). Assessing gait impairment following experimental traumatic brain injury in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 176(1), 34-44. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.08.026>
- Ng, S. Y., & Lee, A. Y. W. (2019). Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 528.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00528>

- Nilsson, P., Hillered, L., Pontén, U., & Ungerstedt, U. (1990). Changes in Cortical Extracellular Levels of Energy-Related Metabolites and Amino Acids following Concussive Brain Injury in Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *10*(5), 631-637. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1990.115>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). *Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo*. *308*, 6.
- OMS | Los traumatismos: El problema sanitario desatendido en los países en desarrollo. (s. f.). WHO; World Health Organization. Recuperado 17 de enero de 2021, de <https://www.who.int/bulletin/volumes/87/4/08-052290/es/>
- O'Neill, J. S., & Feeney, K. A. (2014). Circadian Redox and Metabolic Oscillations in Mammalian Systems. *Antioxidants & Redox Signaling*, *20*(18), 2966-2981. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5582>
- Ontiveros, Á., Preciado, A. K., Matute, E., López-Cruz, M., & López-Elizalde, R. (2014). Factores pronósticos de recuperación y reinserción laboral en adultos con traumatismo craneoencefálico. *Revista Mexicana de Neurociencias*, *15*(4), 7.
- Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states: Microglia bioenergetics with acute polarization. *British Journal of Pharmacology*, *173*(4), 649-665. <https://doi.org/10.1111/bph.13139>
- Ozolins, B., Aimers, N., Parrington, L., & Pearce, A. J. (2016). Movement disorders and motor impairments following repeated head trauma: A systematic review of the literature 1990–2015. *Brain Injury*, *30*(8), 937-947. <https://doi.org/10.3109/02699052.2016.1147080>
- Palmer, A. M., Marion, D. W., Botscheller, M. L., Swedlow, P. E., Styren, S. D., & DeKosky, S. T. (1993). Traumatic Brain Injury-Induced Excitotoxicity Assessed in a Controlled Cortical Impact Model. *Journal of Neurochemistry*, *61*(6), 2015-2024. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb07437.x>
- Pavlovic, D., Pekic, S., Stojanovic, M., & Popovic, V. (2019). Traumatic brain injury: Neuropathological, neurocognitive and neurobehavioral sequelae. *Pituitary*, *22*(3), 270-282. <https://doi.org/10.1007/s11102-019-00957-9>
- Peters, A. J., Liu, H., & Komiyama, T. (2017). Learning in the Rodent Motor Cortex.

- Annual Review of Neuroscience*, 40(1), 77-97. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031407>
- Piot-Grosjean, O., Wahl, F., Gobbo, O., & Stutzmann, J.-M. (2001). Assessment of Sensorimotor and Cognitive Deficits Induced by a Moderate Traumatic Injury in the Right Parietal Cortex of the Rat. *Neurobiology of Disease*, 8(6), 1082-1093. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0450>
- Purves, Augustine, Fitzpatrick, Hall, LaMantia, & White. (2016). *Neurociencia* (5.^a ed.). Panamericana.
- Raj, K., Bhatia, R., Prasad, K., Padma Srivastava, M. V., Vishnubhatla, S., & Singh, M. B. (2015). Seasonal Differences and Circadian Variation in Stroke Occurrence and Stroke Subtypes. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 24(1), 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2014.07.051>
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 19(8), 987-991. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>
- Real Academia Española. (s. f.-a). Trauma. En *Diccionario de la Lengua Española* (23.^a ed.). Recuperado 17 de enero de 2021, de <https://dle.rae.es/trauma>
- Real Academia Española. (s. f.-b). Traumatismo. En *Diccionario de la Lengua Española* (23.^a ed.). Recuperado 17 de enero de 2021, de <https://dle.rae.es/traumatismo>
- Refinetti, R. (2015). Comparison of light, food, and temperature as environmental synchronizers of the circadian rhythm of activity in mice. *The Journal of Physiological Sciences*, 65(4), 359-366. <https://doi.org/10.1007/s12576-015-0374-7>
- Rodgers, K. M., Deming, Y. K., Bercum, F. M., Chumachenko, S. Y., Wieseler, J. L., Johnson, K. W., Watkins, L. R., & Barth, D. S. (2014). Reversal of Established Traumatic Brain Injury-Induced, Anxiety-Like Behavior in Rats after Delayed, Post-Injury Neuroimmune Suppression. *Journal of Neurotrauma*, 31(5), 487-497. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.3090>
- Rodriguez, C., Agulla, J., & Delgado-Esteban, M. (2021). Refocusing the Brain: New Approaches in Neuroprotection Against Ischemic Injury. *Neurochemical Research*, 46(1), 51-63. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03016-z>
- Roome, R. B., & Vanderluit, J. L. (2015). Paw-Dragging: A Novel, Sensitive Analysis of the Mouse Cylinder Test. *Journal of Visualized Experiments*, 98, 52701.

<https://doi.org/10.3791/52701>

- Rosenbaum, S. B., & Lipton, M. L. (2012). Embracing chaos: The scope and importance of clinical and pathological heterogeneity in mTBI. *Brain Imaging and Behavior*, 6(2), 255-282. <https://doi.org/10.1007/s11682-012-9162-7>
- Rosenfeld, J. V., Maas, A. I., Bragge, P., Morganti-Kossmann, M. C., Manley, G. T., & Gruen, R. L. (2012). Early management of severe traumatic brain injury. *Lancet*, 380(9847), 1088-1098. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60864-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60864-2)
- Sahar, S., & Sassone-Corsi, P. (2012). Regulation of metabolism: The circadian clock dictates the time. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.10.005>
- Savchenko, V. L., McKanna, J. A., Nikonenko, I. R., & Skibo, G. G. (2000). Microglia and astrocytes in the adult rat brain: Comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience*, 96(1), 195-203. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00538-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00538-2)
- Scheer, F. A. J. L., & Shea, S. A. (2014). Human circadian system causes a morning peak in prothrombotic plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) independent of the sleep/wake cycle. *Blood*, 123(4), 590-593. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-517060>
- Scheiermann, C., Gibbs, J., Ince, L., & Loudon, A. (2018). Clocking in to immunity. *Nature Reviews Immunology*, 18(7), 423-437. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0008-4>
- Simon, D. W., McGeachy, M. J., Bayir, H., Clark, R. S. B., Loane, D. J., & Kochanek, P. M. (2017). The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nature Reviews Neurology*, 13(3), 171-191. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.13>
- Skandsen, T., Kvistad, K. A., Solheim, O., Strand, I. H., Folvik, M., & Vik, A. (2010). Prevalence and impact of diffuse axonal injury in patients with moderate and severe head injury: A cohort study of early magnetic resonance imaging findings and 1-year outcome. *Journal of Neurosurgery*, 113(3), 556-563. <https://doi.org/10.3171/2009.9.JNS09626>
- Sofroniew, M. V. (2014). Multiple Roles for Astrocytes as Effectors of Cytokines and Inflammatory Mediators. *The Neuroscientist*, 20(2), 160-172.

<https://doi.org/10.1177/1073858413504466>

- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7-35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Susarla, B. T. S., Villapol, S., Yi, J.-H., Geller, H. M., & Symes, A. J. (2014). Temporal Patterns of Cortical Proliferation of Glial Cell Populations after Traumatic Brain Injury in Mice. *ASN Neuro*, *6*(3), AN20130034. <https://doi.org/10.1042/AN20130034>
- Sussman, E. S., Pendharkar, A. V., Ho, A. L., & Ghajar, J. (2018). Mild traumatic brain injury and concussion: Terminology and classification. En *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 158, pp. 21-24). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63954-7.00003-3>
- Takayama, F., Hayashi, Y., Wu, Z., Liu, Y., & Nakanishi, H. (2016). Diurnal dynamic behavior of microglia in response to infected bacteria through the UDP-P2Y6 receptor system. *Scientific Reports*, *6*(1), 30006. <https://doi.org/10.1038/srep30006>
- Tan, Y.-L., Yuan, Y., & Tian, L. (2020). Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Molecular Psychiatry*, *25*(2), 351-367. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0609-8>
- Tennant, K. A., Asay, A. L., Allred, R. P., Ozburn, A. R., Kleim, J. A., & Jones, T. A. (2010). The Vermicelli and Capellini Handling Tests: Simple quantitative measures of dexterous forepaw function in rats and mice. *Journal of Visualized Experiments*, *41*, 2076. <https://doi.org/10.3791/2076>
- Terzibasi-Tozzini, E., Martinez-Nicolas, A., & Lucas-Sánchez, A. (2017). The clock is ticking. Ageing of the circadian system: From physiology to cell cycle. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *70*, 164-176. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.06.011>
- Thosar, S. S., Butler, M. P., & Shea, S. A. (2018). Role of the circadian system in cardiovascular disease. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(6), 2157-2167. <https://doi.org/10.1172/JCI80590>
- Tremblay, M.-E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., & Nimmerjahn, A. (2011). The Role of Microglia in the Healthy Brain. *Journal of Neuroscience*, *31*(45), 16064-16069. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011>
- Tsenter, J., Beni-Adani, L., Assaf, Y., Alexandrovich, A. G., Trembovler, V., & Shohami,

- E. (2008). Dynamic Changes in the Recovery after Traumatic Brain Injury in Mice: Effect of Injury Severity on T2-Weighted MRI Abnormalities, and Motor and Cognitive Functions. *Journal of Neurotrauma*, 25(4), 324-333.
<https://doi.org/10.1089/neu.2007.0452>
- Vajda, F. J. E. (2002). Rodrigue. *Journal of Clinical Neuroscience*, 9(1), 4-8.
<https://doi.org/10.1054/jocn.2001.1027>
- van Velzen, J. M., van Bennekom, C. A. M., Edelaar, M. J. A., Sluiter, J. K., & Frings-Dresen, M. H. W. (2009). How many people return to work after acquired brain injury?: A systematic review. *Brain Injury*, 23(6), 473-488.
<https://doi.org/10.1080/02699050902970737>
- Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiol Rev*, 98, 151.
- Vinall, P. E., Kramer, M. S., Heinel, L. A., & Rosenwasser, R. H. (2000). Temporal changes in sensitivity of rats to cerebral ischemic insult. *Journal of Neurosurgery*, 93(1), 82-89. <https://doi.org/10.3171/jns.2000.93.1.0082>
- Vos, T., Lim, S. S., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abbasi, M., Abbasifard, M., Abbasi-Kangevari, M., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abdollahi, M., Abdollahpour, I., Abolhassani, H., Aboyans, V., Abrams, E. M., Abreu, L. G., Abrigo, M. R. M., Abu-Raddad, L. J., Abushouk, A. I., ... Murray, C. J. L. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 396(10258), 1204-1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
- Wakita, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Lin, J.-X., Miyamoto, K., & Oka, N. (1999). A cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates white matter damage in chronic cerebral ischemia. *NeuroReport*, 10(7), 1461-1465. <https://doi.org/10.1097/00001756-199905140-00013>
- Wilking, M., Ndiaye, M., Mukhtar, H., & Ahmad, N. (2013). Circadian Rhythm Connections to Oxidative Stress: Implications for Human Health. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(2), 192-208. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4889>
- Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M., & Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 619-643.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>

- Wright, A., & Vissel, B. (2012). The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00034>
- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B. A., & Stevens, B. (2015). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends in Immunology*, 36(10), 605-613. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.008>
- Young, K., & Morrison, H. (2018). Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. *Journal of Visualized Experiments*, 136, 57648. <https://doi.org/10.3791/57648>
- Zhou, Y., Shao, A., Yao, Y., Tu, S., Deng, Y., & Zhang, J. (2020). Dual roles of astrocytes in plasticity and reconstruction after traumatic brain injury. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00549-2>

13. ARTÍCULOS ANEXOS Y TRABAJOS EN CONGRESOS



Diurnal Variation Induces Neurobehavioral and Neuropathological Differences in a Rat Model of Traumatic Brain Injury

Ricardo Jesus Martinez-Tapia¹, Francisco Estrada-Rojo¹,
Teresita Guadalupe Lopez-Aceves², Veronica Rodríguez-Mata³, Armando Perez-Torres³,
Antonio Barajas-Martinez¹, Stephany Garcia-Velasco¹, Perla Ugalde-Muñiz¹ and
Luz Navarro^{1*}

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ² Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Mexico, ³ Departamento de Biología Celular y Tissular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Cecilia Santos,
University of Beira Interior, Portugal

Reviewed by:

William David Todd,
University of Wyoming, United States
Guang Yang,
Columbia University Irving Medical
Center, United States

*Correspondence:

Luz Navarro
lnavarro@unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Sleep and Circadian Rhythms,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 23 May 2020

Accepted: 25 August 2020

Published: 29 September 2020

Citation:

Martinez-Tapia RJ,
Estrada-Rojo F, Lopez-Aceves TG,
Rodríguez-Mata V, Perez-Torres A,
Barajas-Martinez A, Garcia-Velasco S,
Ugalde-Muñiz P and Navarro L (2020)
Diurnal Variation Induces
Neurobehavioral
and Neuropathological Differences
in a Rat Model of Traumatic Brain
Injury. *Front. Neurosci.* 14:564992.
doi: 10.3389/fnins.2020.564992

Traumatic brain injury (TBI) induces two types of brain damage: primary and secondary. Damage initiates a series of pathophysiological processes, such as metabolic crisis, excitotoxicity with oxidative stress-induced damage, and neuroinflammation. The long-term perpetuation of these processes has deleterious consequences for neuronal function. However, it remains to be elucidated further whether physiological variation in the brain microenvironment, depending on diurnal variations, influences the damage, and consequently, exerts a neuroprotective effect. Here, we established an experimental rat model of TBI and evaluated the effects of TBI induced at two different time points of the light–dark cycle. Behavioral responses were assessed using a 21-point neurobehavioral scale and the cylinder test. Morphological damage was assessed in different regions of the central nervous system. We found that rats that experienced a TBI during the dark hours had better behavioral performance than those injured during the light hours. Differences in behavioral performance correlated with less morphological damage in the perilesional zone. Moreover, certain brain areas (CA1 and dentate gyrus subregions of the hippocampus) were less prone to damage in rats that experienced a TBI during the dark hours. Our results suggest that diurnal variation is a crucial determinant of TBI outcome, and the hour of the day at which an injury occurs should be considered for future research.

Keywords: traumatic brain injury, diurnal variation, neuronal damage, behavioral tests, circadian rhythms

INTRODUCTION

Traumatic brain injury (TBI) is defined as the alteration of brain function, or other evidence of brain pathology, caused by an external force (Menon et al., 2010). TBI is a severe public health problem: in 2016, the number of new cases of TBI amounted to 27.08 million worldwide (GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators, 2019). In the United States alone, the Center for Disease Control and Prevention (CDC) reports 1.7 million cases annually, including approximately 275,000 hospitalizations and 52,000 deaths (Faul et al., 2010).

TBI causes two types of brain damage: primary damage is the result of tearing, shearing and rupture of nervous tissue and is considered irreversible; secondary damage is a cascade of pathophysiological processes that could exacerbate the damage of the primary lesion (Maas et al., 2008). Some of these pathophysiological processes, namely excitotoxicity through N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor expression (Estrada-Rojo et al., 2018), oxidative stress (O'Neill and Feeney, 2014), and neuroinflammation (Griffin et al., 2019) are related to diurnal variation in the levels of hormones, neurotransmitters, and metabolic intermediates of cognitive pathways. Fonken et al. (2015) found that microglia isolated from the rat hippocampus during the light phase exhibit significantly greater immune response than those isolated during the dark phase. They also found that rats injected with lipopolysaccharide during the light phase have higher sickness behavior scores and hippocampal cytokine production than rats injected with lipopolysaccharide during the dark phase. Differences in immune response activation could be reflected in social behavioral tests.

Several studies have shown that the time at which a pathological event occurs can influence the extent of the damage. The time of onset of cerebral vascular accidents and transient ischemic attacks occurs most often in the early hours of the morning (Raj et al., 2015; Ripamonti et al., 2017). Animal studies have also shown diurnal variation in ischemia-induced damage. For example, Vinall et al. (2000) reported more significant damage if ischemia was induced in the last hours of darkness, while Beker et al. (2018) reported less damage if ischemia was induced during the mid-dark period.

We have previously reported that recovery from TBI varies depending on the time of the day it occurs. A neurobehavioral test showed that rats with brain trauma induced during the dark hours score better than those traumatized during daylight hours (Martínez-Vargas et al., 2006, 2013; Estrada-Rojo et al., 2018). We hypothesized that general health parameters (e.g., body weight and food intake) and neurobehavioral test performance might also present diurnal variation and correlate with morphological damage in different areas of the central nervous system (CNS). Therefore, in this study, we evaluated the effects of TBI induced at two different time points of the light–dark cycle using a 21-point neurobehavioral scale and the cylinder test, a spontaneous motor test. We also correlated diurnal variation in the responses to TBI with structural damage in specific areas of the CNS.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (250–300 g; 10–12 weeks) were housed individually in a room temperature of $21 \pm 2^\circ\text{C}$ with food and water *ad libitum*. Rats were given at least 15 days to acclimate to the room's conditions before starting experimentation. All rats were maintained on a 12:12 h light: dark cycle, with lights on either at 08:00 or 20:00 h. Measurements of general health parameters (food intake and body weight) were performed daily at the same time (12:00 h) before and after the induction

of TBI. All experiments were conducted according to the recommendations of the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (project, 018/2016; approved April 05, 2016), the Animal Care and Use Committee, and the Mexican Official Regulations (NOM 062-ZOO-1999).

Experimental Design

Rats were divided into two groups: day and night. Experiments in the day group were performed during the hours of light, and TBI was induced at 13:00 h (5 h after the lights were on); experiments in the night group were performed during the hours of darkness, and TBI was induced at 01:00 h (5 h after the lights were off). Behavioral testing was performed at 24 and 72 h after TBI. In the night group, both, TBI and behavioral testing were performed in a dark room with a red light at $< 10\text{ lx}$ to avoid disturbances in the sleep-wakefulness cycle (Stenvers et al., 2016; Zhang et al., 2017). Rats in both groups, day and night, were further divided into Sham ($n = 10$) and TBI subgroups ($n = 10$ per subgroup).

TBI

Rats were anesthetized inside of an acrylic gas-anesthesia chamber (25 cm \times 11 cm \times 10 cm). Anesthesia was induced with 4.0% isoflurane (Sofloran[®]Vet, PiSA Agropecuaria, Hgo., Mexico) supplemented with O₂. Upon loss of righting reflex, each rat was removed from the chamber and placed in a nose cone connected to the same isoflurane supply, now adapted to a stereotaxic device. The concentration of isoflurane was reduced to 3.0% to maintain an appropriate anesthetic depth during surgery. Then, the heads were disinfected with chlorhexidine, and a midline incision was made to expose the skull. Subsequently, the site of trauma (primary motor cortex) was located with the stereotaxic device at coordinates $P = -2$ and $L = 1.4$ (Paxinos and Watson, 1998). Trauma was induced with a pneumatic piston calibrated at 40 psi of pressure and at a depth of 6 mm (Verdugo-Díaz et al., 2017; Estrada-Rojo et al., 2018). After the induction of TBI, isoflurane administration was stopped, and the rat was placed back in its cage. The rat was positioned in a dorsal recumbency to test reflexes until regaining the righting reflex. Subjects in the sham group were only anesthetized.

Neurobehavioral Scale

Motor deficit after TBI was measured using a previously described 21-point neurobehavioral scale (Hunter et al., 2000). Measurements were taken at baseline (24 h before TBI) as well as at 24 and 72 h after TBI. A blinded observer recorded the neurobehavioral scale score for each rat. The following items were evaluated: paw placement [4 points (pts)], righting reflex (1 pt), horizontal-bar (3 pts), inclined platform (3 pts), rotation (2 pts), visual forepaw reaching (2 pts), contralateral reflex (1 pt), circling (1 pt), motility (2 pts), and general condition (2 pts). The maximum score in healthy rats was set to 21 pts. Although this scale was primarily designed to evaluate cerebral ischemia, cerebral ischemia and trauma share similar pathophysiological mechanisms (Leker and Shohami, 2002). In fact, we have previously used this scale to assess neurological

damage after TBI (Martinez-Vargas et al., 2012, 2014; Estrada-Rojo et al., 2018).

Cylinder Test

Functional recovery is usually assessed with behavioral tests that measure functional deficits; in this study, we measured the motor skills associated with damage to specific brain regions. Several motor control tests indicate trauma- or ischemia-induced brain damage in the cortex sensorimotor area. The cylinder test is widely used in rats to evaluate functional deficits in forelimb activity (Roome and Vanderluit, 2015). To measure spontaneous motor activity and limb use asymmetry after TBI, we used the cylinder test as described previously (Rodgers et al., 2014). Measurements were taken at baseline (24 h before TBI) as well as at 24 and 72 h after TBI. A 15-cm diameter acrylic cylinder was used; the rats were placed inside and their activity was recorded. A blinded observer analyzed the videos at a later time. The number of times the rat placed the left or right leg, or both, on the cylinder wall was scored.

Tissue Processing and Staining

Rats ($n = 4$, per time point) were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (Pisabental®, 50 mg/kg i.p., PiSA Agropecuaria, Hgo., México) at 24 or 72 h after induction of TBI. Then, they were perfused transcardially with sodium phosphate buffer, followed by 4% buffered paraformaldehyde. The brains were removed immediately after perfusion and then submerged in the same fixative for at least 24 h. Then, the brains were rinsed with tap water, dehydrated by immersion in ascending ethanol grades, cleared in xylene, and embedded in paraffin with proper orientation to obtain three series of 4- μ m-thick sagittal sections, from the midline to the left side of the brain (the TBI zone). The sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) to examine the histopathological changes.

Image Acquisition

Morphological changes were analyzed in four different areas: three subregions of the hippocampus [CA1, CA2/3, and dentate gyrus (DG)] and a perilesional cortex (Cx) area adjacent to the trauma site. We obtained a total of 50 fields with a 40 \times objective with an area per field calculated previously at 19,700 μ m². Images were acquired using a CX31 Olympus microscope equipped with a digital camera and analyzed with Infinity Analyze® software (version 6.3.0).

Morphometric Analysis

Cell counts were obtained from the Cx in all fields of the three tissue sections. Image analysis was performed to determine the presence of normal neurons (NN), neurons with changes (NCh), and degenerating neurons (DN) according to the criteria established in Table 1. Also, changes in reactivity astrocyte were assessed based on cellular and nuclear size and the chromatin aspect (Garman, 2011); as well, vasculature was straightforwardly observed based on the lumen size compared with its sham subgroup. Average counts were calculated for each rat from three experienced blinded observers. In the three subregions of the

TABLE 1 | Criteria for cell count based on neuronal morphology.

NN	NCh	DN*
<ul style="list-style-type: none"> • Large nucleus with open chromatin and a prominent nucleolus • Cell bodies with abundant cytoplasm, variable Nissl substance (rough endoplasmic reticulum) • Shape and size of the cell body 	<ul style="list-style-type: none"> • Collapsed, dark nucleus, and poorly defined nucleolus • Decreased neuronal size (shrunken or contracted) • Basophilic inclusion bodies in the perikaryon • Cytoplasm appears condensed and stains darkly (dark neurons) 	<ul style="list-style-type: none"> • Cell body shrinkage • Loss of Nissl substance • Small/shrunken, darkly stained (pyknotic) nucleus that might eventually undergo fragmentation (karyorrhexis) • Cell membrane rupture Intense eosinophilic staining of the cytoplasm

NN, normal neurons; NCh, neurons with changes; DN, degenerating neurons. *The name and morphological characteristics are based on the work published by Garman, 2011.

hippocampus, the percentage of DN regarding the total number of neurons per field was set on to observe the tissue response to secondary damage. Finally, the counts in the three tissue sections were averaged. FIJI software (v.2.0.0)¹ was used for cell counting and to determine the field area.

Statistical Analyses

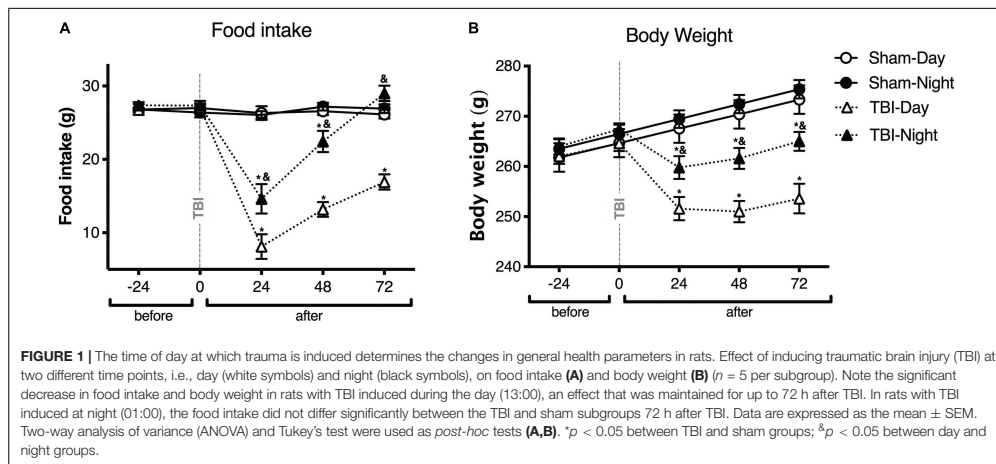
The results are reported as the mean values \pm standard error of mean (SEM). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, United States). Unless otherwise indicated, data met the assumptions of equal variances (Spearman's test for heteroscedasticity and homoscedasticity plot). Statistical significance was assessed with two-way analysis of variance and Tukey's multiple comparisons corrections for food intake, body weight, cylinder test, and neuronal counting, and Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests for neurological scores. Differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

RESULTS

General Health Parameters Vary Depending Upon the Time of TBI Induction

To test whether the general health parameters changed depending upon the time of TBI induction in rats, food intake and body weight were measured in both sham and TBI subgroups before and at 24, 48, and 72 h after TBI (Figure 1). Food intake differed in both day and night groups, at 24, 48, and 72 h after the TBI, compared to baseline [$F_{(4,64)} = 59.05$, $p < 0.0001$]. Moreover, there were significant differences between day and night groups [$F_{(3,16)} = 73.73$, $p < 0.0001$]; food intake decreased significantly 24 h after TBI in the day group as compared with the night group (*post-hoc* $p < 0.0001$). This difference was

¹<https://imagej.net/Fiji>



maintained even after 48 h ($p < 0.0001$), and 72 h ($p < 0.0001$). The night group showed an increased food intake compared with the baseline of the sham subgroup 72 h after TBI; however, this difference was not statistically significant ($p = 0.38$; **Figure 1A**). Meanwhile, there was a significant decrease in body weight in the day and night groups at 24, 48, and 72 h after TBI [$F_{(4,64)} = 53.07$, $p < 0.0001$]. Similarly, differences in body weight were observed between the day and night groups [$F_{(3,16)} = 44.69$, $p < 0.0001$], with more significant weight loss at 24 h after TBI in the day group than in the night group ($p < 0.0001$). Finally, a tendency to regain body weight was observed between 48 and 72 h after TBI; however, the extent of recovery in body weight did not match that of the sham subgroup (**Figure 1B**).

Neurobehavioral Scale and Cylinder Test Scores Vary Depending Upon the Time of TBI Induction

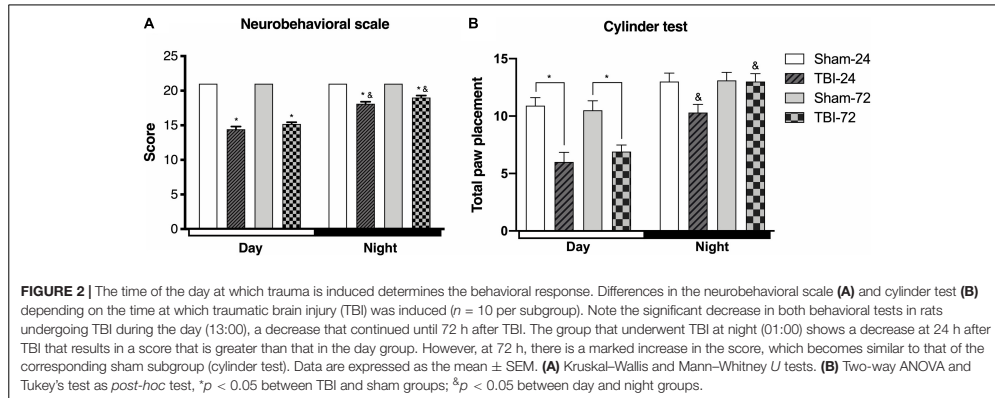
Functional changes following TBI were assessed using two neurobehavioral tests (**Figure 2**). A comparison of the total score 21-point neurobehavioral scale (**Figure 2A**) showed a decrease in the day group as compared with the sham group at both 24 h ($p < 0.0001$) and at 72 h after TBI ($p < 0.001$). Moreover, the rats with TBI in the night group presented a decrease in the score at 24 h ($p < 0.0001$), and 72 h ($p < 0.0001$), compared with its corresponding sham group. However, the analysis between the day and night group showed significant differences in the total 21-point neurobehavioral scale score; the score was better in the night group at both 24 h ($p < 0.0001$) and 72 h ($p < 0.0001$) after TBI than in the day groups.

A detailed description of each specific parameter of the 21-point neurobehavioral scale is shown in **Table 2**. We found a significant decrease compared to its baseline in the day group at 24 h after TBI in paw placement ($p < 0.05$), horizontal bar ($p < 0.05$), inclined platform ($p < 0.05$), rotation ($p < 0.05$),

visual forepaw reaching ($p < 0.05$), circling ($p < 0.05$), and general conditions ($p < 0.05$). At 72 h after TBI, the overall score (as well as the score of five parameters) tended to increase but the differences were not statistically significant. In the night group, at 24 h after trauma there was a significant decrease in only three parameters: horizontal bar ($p < 0.05$), rotation ($p < 0.05$), and general conditions ($p < 0.05$). At 72 h after TBI, only rotation was significantly increased compared to 24 h time point ($p < 0.05$). Other parameters, such as circling, motility, and general condition, tended to decrease compared to the 24-h time point but the differences were not statistically significant. When comparing the day and the night groups at both 24 and 72 h after TBI, we found that paw placement ($p < 0.05$) and rotation ($p < 0.05$) scored better in the night group. Inclined platform ($p < 0.05$) and circling ($p < 0.05$) only scored better and were statistically significant at 24 h after TBI; and horizontal bar ($p < 0.05$) and visual forepaw reaching ($p < 0.05$) were significantly different only at 72 h after trauma. Finally, righting reflex and contralateral reflex were not affected, neither by TBI nor the time it occurred.

To test spontaneous exploration and limb use asymmetry after TBI, we used the cylinder test (**Figure 2B**). In the day group, there were differences in the time after the induction of the trauma [$F_{(3,54)} = 11.84$, $p < 0.0001$], at both 24 h ($p < 0.0001$) and 72 h ($p < 0.0001$) after TBI, when compared with the sham subgroup. However, the rats with TBI in the night group did not show statistically significant differences in total paw placement at 24 h ($p = 0.057$) or 72 h ($p = 0.999$) compared with the corresponding sham subgroup. Finally, there were significant differences in spontaneous exploration between both the day and night groups [$F_{(1,18)} = 53.93$, $p < 0.0001$]; compared with the day group, the score was higher in the night group at both 24 h ($p = 0.0004$) and 72 h ($p < 0.001$) after TBI.

A detailed analysis of limb use asymmetry was performed (**Supplementary Figure S1**). Contralateral limb use (right paw)



was significantly different between the TBI and sham subgroups [$F_{(3,54)} = 7.208$, $p = 0.0004$, *post-hoc*: $p = 0.0211$] of the day group, at 72 h after TBI. In the night group, a difference in limb use asymmetry was found only at 24 h after TBI ($p = 0.0271$), but not at 72 h ($p = 0.418$), compared with the corresponding sham subgroup. There was also a significant difference in limb use asymmetry between the day and night groups [$F_{(1,18)} = 24.19$, $p = 0.0001$; **Supplementary Figure S1A**], however, *post-hoc* analysis showed no significant difference in the TBI subgroups in both day and night groups at 24 h ($p = 155$) and 72 h ($p = 0.0750$).

Finally, time of TBI induction had no significant effect on the use of the ipsilateral limb (left paw) [$F_{(3,54)} = 1.146$, $p = 0.338$]. Nevertheless, in the day group, *post-hoc* analysis showed a significant difference between the TBI and sham subgroups at 24 h ($p = 0.0311$). However, no such significant difference was found in the night group. Differences between the day and night groups were found [$F_{(1,18)} = 8.201$, $p = 0.0103$; **Supplementary Figure S1B**] only at 72 h after TBI ($p = 0.0012$).

The Time of Day at Which TBI Occurs Determines the Degree of Cell Injury in the Perilesional Zone (Motor Cortex) of the CNS

To determine whether the damage evaluated by neurobehavioral tests correlated with morphological damage, formalin-fixed paraffin-embedded brain tissue sections were obtained and stained with HE. The perilesional zone of the site of TBI (motor cortex) was examined with a light microscope. The histopathological observations are presented in **Figure 3**. The figure legends describe the histopathological changes at 24 and 72 h after TBI in the day group (**Figures 3A–C**) and night group (**Figures 3D–F**). Findings such as vascular congestion, vasodilation, hemorrhage and necrosis in the perilesional zone at TBI are not shown so as to highlight the neuronal changes. The total neuron count (**Figure 3H**) in the perilesional zone of the site of TBI (motor cortex) varied significantly with time [$F_{(2,12)} = 173.9$, $p < 0.0001$] and experimental groups (day

group vs. night group) [$F_{(1,12)} = 33.97$, $p < 0.0001$]. The total neuron count in the TBI subgroup at 24 h in both the day group ($p < 0.0001$) and the night group ($p = 0.0008$) was significantly lower than that in the corresponding sham subgroups. However, at 72 h, the total decrease in neurons was maintained in the night group ($p = 0.0793$) but decreased further in the day group ($p < 0.0001$). Neuron count between the day and night groups showed no significant differences at 24 h after TBI ($p = 0.6144$), but statistically significant differences were observed at 72 h after TBI ($p < 0.0001$). NN count was considerably low, while NCh and DN counts were high at 24 and 72 h after TBI (**Figure 3I**) in both day and night groups.

NN count varied significantly with time (24 and 72 h) [$F_{(2,12)} = 10,748$, $p < 0.0001$] and experimental groups (day and night groups) [$F_{(2,12)} = 29.15$, $p = 0.0002$]. At 24 h after TBI, a significant decrease in NN was observed in both in the day group ($p < 0.0001$) and the night group ($p < 0.0001$) but no significant differences were observed between the two groups. However, at 72 h after TBI, there was a significant difference between the day and night groups ($p = 0.0005$).

With regard to NCh count, a significant effect was observed in time [$F_{(2,12)} = 105.2$, $p < 0.0001$] and experimental groups [$F_{(1,12)} = 80.46$, $p < 0.0001$]. There were significant differences in NCh counts between TBI subgroups of day and night groups at 72 h after TBI ($p < 0.0001$), but not at 24 h ($p = 0.1069$).

Finally, DN count, also varied significantly with time [$F_{(2,12)} = 105.2$, $p < 0.0001$] and experimental groups [$F_{(1,12)} = 80.46$, $p < 0.0001$]. There were significant differences in DN counts between TBI subgroups of day and night groups at 72 h after TBI ($p = 0.0058$), but not at 24 h ($p = 0.2895$).

TBI-Induced Neuronal Damage Is Specific to Certain Hippocampal Subregions and Follows a Diurnal Pattern

To study the histopathological extent of secondary brain damage after TBI, we performed morphometric analysis of DN in three

TABLE 2 | Specific parameters of the neurobehavioral scale.

Parameter. Description (Maximum score)	Day (n = 10)			Night (n = 10)			p
	Baseline	24 h	72 h	Baseline	24 h	72 h	
Paw placement. The animal held lengthways at the edge of bench and each paw placed in turn on the edge of the bench. Each successful paw placement back on bench scored 1 point (4)	4	2.6 ± 0.34*	2.8 ± 0.20*	4	3.7 ± 0.15 ^Δ	3.9 ± 0.10 ^Δ	<0.0001
Righting reflex. The animal is placed on its back on palm of the hand. Scored 1 if righted itself (1)	1	1 ± 0.00	1 ± 0.00	1	1 ± 0.0	1 ± 0.0	ns
Horizontal bar. Forepaws placed on ribbed bar. Score: 3 if both hindlimbs raised onto the bar, 2 if one hindlimb raised, 1 if animal just hangs and 0 if animal falls off (3)	3	1.9 ± 0.18*	2.1 ± 0.28*	3	2.3 ± 0.21*	2.8 ± 0.13 ^Δ	<0.0001
Inclined platform. The animal is placed facing down at an inclination of 45°. Score: 3 if the animal rotates to face "uphill" within 15 s, 2 if it takes 15–30 s, 1 if it takes longer than 30 s and 0 if the animal falls off or remains pointing downwards (3)	3	2.2 ± 0.29*	2.5 ± 0.17*	3	2.9 ± 0.10 ^Δ	2.9 ± 0.10	0.0011
Rotation. Animal is held by the base of the tail and rotated clockwise then anticlockwise. Animal should swivel up contralaterally to the direction of rotation. Score 1 for each side (2)	2	0.9 ± 0.10*	1.2 ± 0.20*	2	1.4 ± 0.16* ^Δ	2.0 ± 0.00 ^{Δ,δ}	<0.0001
Visual forepaw reaching. Ability of animal to reach to bench when held slightly away from it. Score 1 for each successful forepaw placement (2)	2	1.6 ± 0.16*	1.6 ± 0.16*	2	1.7 ± 0.15	2.0 ± 0.00 ^Δ	0.0178
Contralateral reflex. Gently touch the animal from the side. Score 0 for a reflex and 1 for no reflex (1)	1	1 ± 0.00	1 ± 0.00	1	1 ± 0.00	1 ± 0.00	ns
Circling. Score 1 for non-circling, 0 for circling (1)	1	0.3 ± 0.15*	0.4 ± 0.16*	1	0.9 ± 0.10 ^Δ	0.8 ± 0.13	0.0002
Motility. Score 2 for normal motility, 1 rocking and unsteady and 0 if immobile (2)	2	1.9 ± 0.10	1.6 ± 0.16*	2	1.9 ± 0.10	1.5 ± 0.17*	0.0104
General condition. Score 2 if normal (good coat condition, alert, moving about), 1 unkempt (e.g., dirty coat, hunched posture, aggressive) and 0 if thin, weak and poor muscle tone (2)	2	1 ± 0.00*	1.0 ± 0.00*	2	1.3 ± 0.15*	1.1 ± 0.10*	<0.0001
Total (21)	21	14.4 ± 0.40*	15.2 ± 0.25*	21	18.1 ± 0.27* ^Δ	19 ± 0.29* ^Δ	<0.0001

Data are expressed as mean ± SEM. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U-test were used as post-hoc test. *p < 0.05 versus sham; ^Δp < 0.05 between day and night; ^δp < 0.05 versus 24 h.

different hippocampal subregions—*Cornus Ammonis* 1, 2, 3 (CA1, 2, and 3) and DG (Figure 4 and Supplementary Figure S2). The histopathological description is found in their respective figure caption. Time [$F_{(1,8)} = 117, p < 0.0001$] and experimental group [$F_{(1,8)} = 26.14, p = 0.0009$] had a significant effect on the percentage of DN in CA1 (Figure 4H). There were no significant differences in DN at 24 h after TBI between day and night groups ($p = 0.8555$); however, at 72 h after TBI, the day group had a higher percentage of DN than the night group ($p = 0.0009$). Meanwhile, the percentage of DN in the DG (Figure 4P) differed significantly with time [$F_{(1,8)} = 37.98,$

$p = 0.0003$] and experimental group [$F_{(1,8)} = 15.86, p = 0.0040$]. There were no significant differences in DN at 24 h after TBI between day and night groups ($p = 0.6157$); however, at 72 h after TBI, the day group had a higher percentage of DN than the night group ($p = 0.0006$). Finally, the percentage of DN in the hippocampal CA2/3 (Supplementary Figure S2) was considerably high between 24 and 72 h after TBI in the day group ($p = 0.0173$); however, this increase was not observed in the night group ($p = 0.3599$). Moreover, there were no significant differences between the two groups at 24 h ($p = 0.8516$) or 72 h ($p = 0.5243$) after TBI.

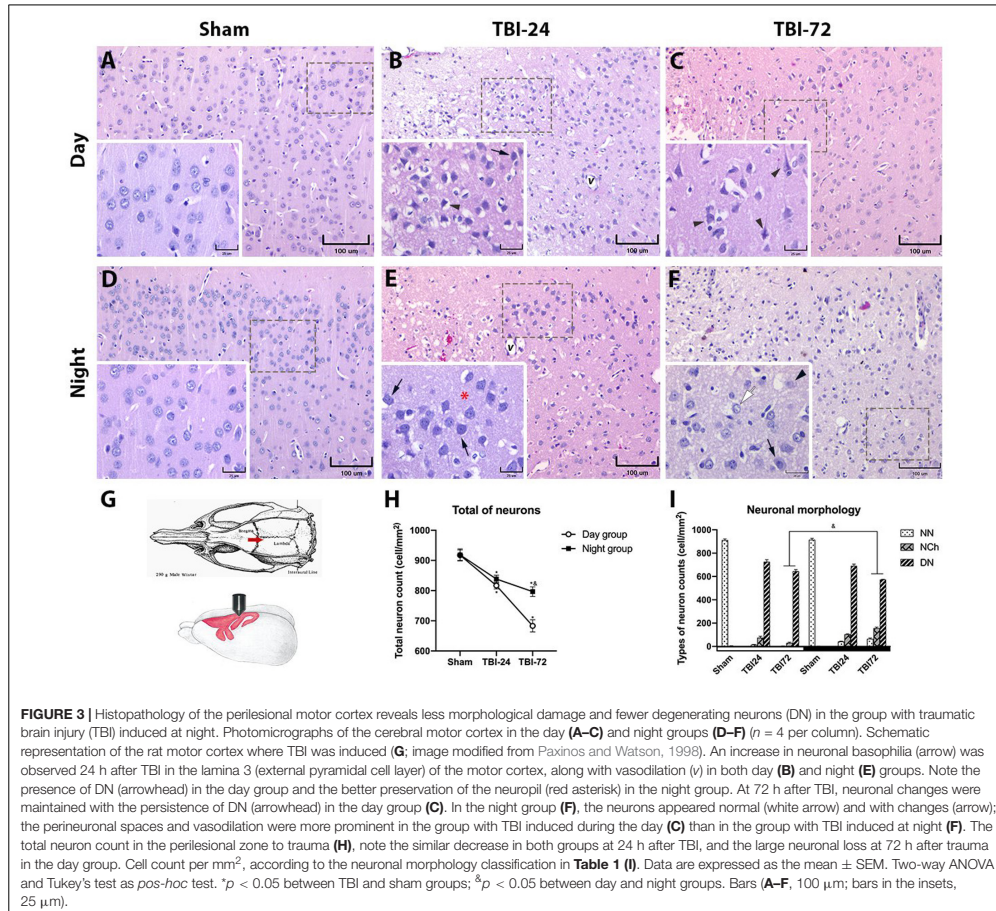


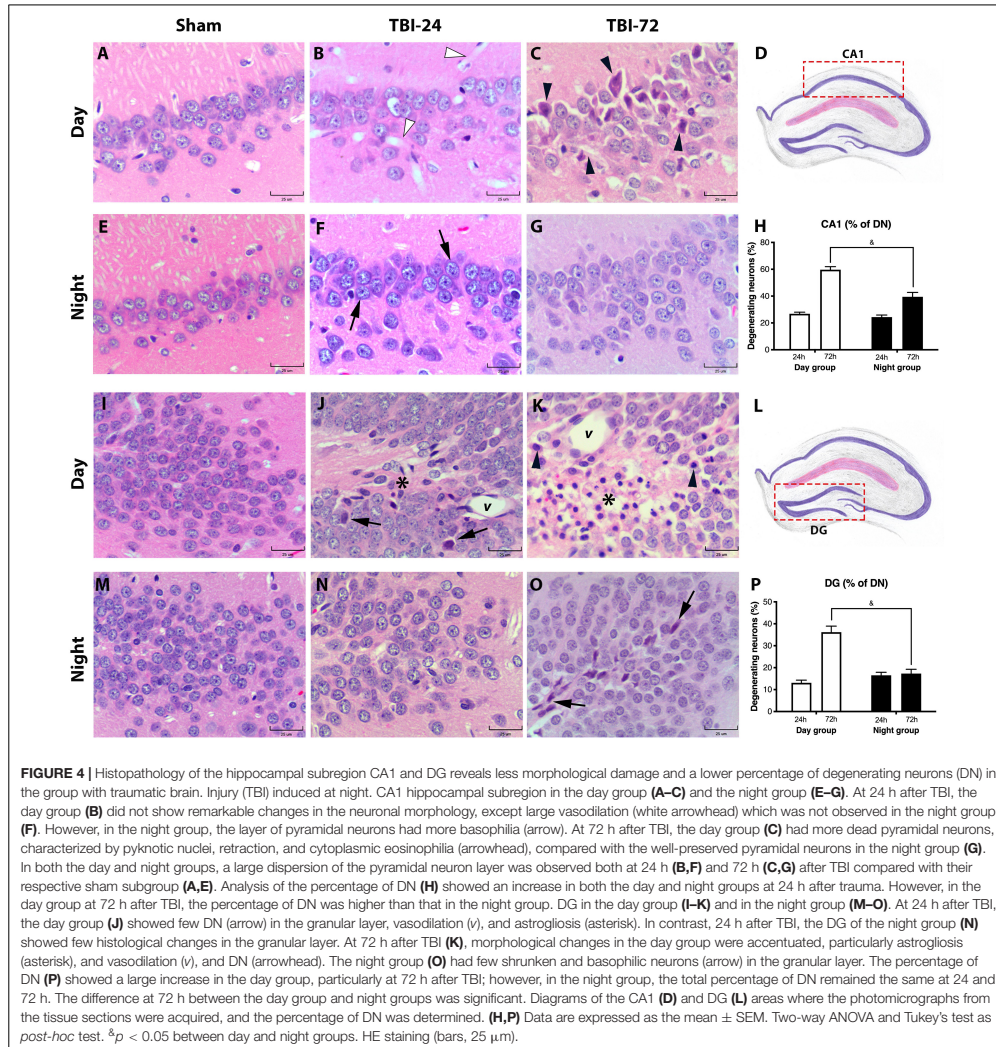
FIGURE 3 | Histopathology of the perilesional motor cortex reveals less morphological damage and fewer degenerating neurons (DN) in the group with traumatic brain injury (TBI) induced at night. Photomicrographs of the cerebral motor cortex in the day (**A–C**) and night groups (**D–F**) ($n = 4$ per column). Schematic representation of the rat motor cortex where TBI was induced (**G**; image modified from Paxinos and Watson, 1998). An increase in neuronal basophilia (arrow) was observed 24 h after TBI in the lamina 3 (external pyramidal cell layer) of the motor cortex, along with vasodilation (v) in both day (**B**) and night (**E**) groups. Note the presence of DN (arrowhead) in the day group and the better preservation of the neuropil (red asterisk) in the night group. At 72 h after TBI, neuronal changes were maintained with the persistence of DN (arrowhead) in the day group (**C**). In the night group (**F**), the neurons appeared normal (white arrow) and with changes (arrow); the perineuronal spaces and vasodilation were more prominent in the group with TBI induced during the day (**C**) than in the group with TBI induced at night (**F**). The total neuron count in the perilesional zone to trauma (**H**), note the similar decrease in both groups at 24 h after TBI, and the large neuronal loss at 72 h after trauma in the day group. Cell count per mm², according to the neuronal morphology classification in **Table 1 (I)**. Data are expressed as the mean \pm SEM. Two-way ANOVA and Tukey's test as *post-hoc* test. * $p < 0.05$ between TBI and sham groups; ^a $p < 0.05$ between day and night groups. Bars (**A–F**), 100 μ m; bars in the insets, 25 μ m).

DISCUSSION

Circadian variations in an organism's physiological variables are essential because they determine the response to environmental events, for example, an injury. However, there is limited research on how these variations determine the degree of injury after TBI. In this study, we showed that general health parameters and scores in two different neurobehavioral tests vary depending on the phase of the light–dark cycle at which TBI occurred. Moreover, these changes correlated with histopathological damage in specific areas of the CNS.

After a TBI, a series of events occur locally and in various systems, at both behavioral and cognitive levels. These events impact the general state of the organism because they can cause loss of the appetite, so that the body's reserves are available,

and therefore its use can lead to weight loss (Martínez, 2011). In a previous study, rats with fluid percussion injury showed a significant decrease in the food intake and body weight 10 days after injury; however, the time of trauma was not considered in the analysis (Moinard et al., 2005). Our results indicated a decline in food intake at 24 h in rats with TBI induced at night, and for up to 72 h in rats with TBI induced during the day. Moreover, rats with TBI induced at night had less weight loss, which could be indicative of a neuroprotective effect of daytime variation. This weight loss has been associated with an increase in hyperglycolysis in the first 24 h after trauma, during which, stored fats become the primary source of energy and proteins are preserved until late in the process (Brooks and Martin, 2015). However, other reports on critical patients have described that numerous metabolic processes might combine to



induce a hypermetabolic state characterized by a marked negative nitrogen balance; moreover, the rate of lean tissue loss is 2–3 times higher than that during starvation and lipolysis decreases as glucose intolerance develops, consequentially raising insulin levels (Burke et al., 1979; Dabrowski and Rombeau, 2000). Our results suggest that this hypermetabolic state is more severe in animals that developed TBI during the day.

Several studies have demonstrated that motor deficits after a TBI can occur in both focal lesions and diffuse models

(Lindner et al., 1998; Crane et al., 2012; Hehar et al., 2015). Our study results show failures in the motor skills of rats with TBI, according to a modified 21-point neurobehavioral scale (Hunter et al., 2000), which evaluated the motor aspects, special perception, and reflexes, and on the cylinder test, which examined motor cortex damage (Roome and Vanderluit, 2015). Interestingly, statistically significant differences in motor deficits were found between the day and night groups at 24 and 72 h after TBI. Nevertheless, our detailed parameter analysis of the

21-point neurobehavioral test showed that some parameters improved over time, regardless of the moment at which we induced the trauma, such as paw placement, horizontal bar, inclined platform, rotation, and visual forepaw reaching. On the other hand, although there were parameters whose scores were decreased, such as cycling, motility and general conditions, these differences were not statistically significant. We consider that these changes are related to a diffuse axonal injury (DAI) generated after TBI. In previous works, it has been reported that neuronal body loss (which we observed in this work) is related to white matter atrophy due to DAI (Armstrong et al., 2016). Diurnal variation in parameters depending of time at which TBI was induced may be related to changes in neurotransmitters such as GABA; for example, some studies have shown the diurnal variation in inhibitory synapses, which increase gradually in the active phase (night) in the mouse somatosensory cortex (Jasinska et al., 2014, 2015). Righting reflex and contralateral reflex were not affected by either TBI or its time of occurrence. The damage caused in our TBI model was in M1, an area that does not emit the upper commands that affect these reflexes. The parameters corresponding to the reflexes are difficult to change since, as we know, the final integration occurs in the spinal cord, and in our model, both the upper commands and those of the spinal cord itself were not affected by TBI (Møller, 2011).

The cylinder test examines the damage to the sensorimotor cortex due to the TBI. In this study, the placement of the paws or the predominance of one when touching the cylinder is a good measure of damage to the sensorimotor cortex of the anterior limb and helps detect motor deficits. Moreover, our results of the analysis of classic forelimb asymmetry (**Supplementary Figure S1**) showed differences between the day and night groups, when evaluated at 24 and 72 h after TBI, which indicates behavioral deficits most fine and consistent (Farr and Whishaw, 2002; Tennant et al., 2010). The 21-point neurobehavioral test showed a significant difference between the groups undergoing TBI during the daytime hours as compared to those with TBI induced at night; additionally, there was a significant difference between both day and night groups evaluated at 24 and 72 h after TBI.

During TBI, the damage can be transmitted as a frontal-to-posterior gradient via a DAI process, but with a greater tendency to damage the frontal pole (Eierud et al., 2014). This reduces the cortical control of higher-order motor functions (Tsenter et al., 2008; Rosenbaum and Lipton, 2012). Our neurobehavioral test results are consistent with those reported in human patients who have slow, asymmetric walking, shorter steps, and more significant mediolateral sway (Ozolins et al., 2016). Additionally, reports indicate balance and subtle motor alterations after TBI (Neumann et al., 2009; Finnanger et al., 2013). However, balance is a complex function, that involves both motor and sensory aspects; additionally, cerebellum might be involved. Moreover, the interpretation of results should consider the fact that the rats use two pairs of limbs for walking, which might compensate for the imbalance caused by neuronal damage (Namdar et al., 2020). Our motor deficiency results also correlate with the count of DN in both the cortex and the hippocampus.

The night group demonstrated less tissue damage in the perilesional motor cortex area, with a greater count of total neurons and fewer DN at 72 h after TBI, compared to the day group. Concerning the pathophysiological complexity after TBI (Giza and Hovda, 2014), our results are consistent with a previous report on variation in NMDA receptor expression in the cerebral cortex through the day, which correlates with a better outcome after a TBI (Estrada-Rojo et al., 2018). Moreover, the resident microglia at the sensory-motor cortex have less branching of cytoplasmic extensions during daylight hours (Hayashi et al., 2013), but a comparatively higher and longer cellular processes and branching points at night (Takayama et al., 2016). These morphological changes suggest a daytime pre-pro-inflammatory microenvironment in the cortex or variations in microglia-mediated inflammatory-immune responses. In the hippocampus, heterogeneity in the cellular response for the CA1, CA2/3, and DG regions after TBI has been described in controlled cortical impact models and in a closed head injury model (Grady et al., 2003; Anderson et al., 2005; Mao et al., 2013; Tsuda et al., 2016), the latter of which is similar to our TBI model. However, none of these previous models considered the effect of diurnal variations at the time of TBI.

Our histopathological findings demonstrated a highly significant neuronal loss, measured through DN percentage, in the CA1 and DG hippocampal subregions in the day group. We consider that the result in the CA1 could be related to a relatively high oxidative state during the day in the hippocampal CA1 pyramidal neurons (Naseri Kouzehgarani et al., 2020). Interestingly, we found that the percentage of DN in the DG did not increase during the night phase, even at 72 h after trauma, which could be related to the presence of microglia in this area, where they could exert an immunoregulatory function (Savchenko et al., 1997; Appel et al., 2018; Tan et al., 2020). In contrast, our results showed that the hippocampal CA3 subregion presented an equal increase in DN in both day and night groups. Previous reports have established a higher susceptibility of the CA3 region in the CCI model (Anderson et al., 2005) and mathematics models (Mao et al., 2013) suggesting that it could be due to a biomechanical component following trauma. We consider that CA3 presents unique and functional specializations made up of DG mossy fiber inputs and broad axon collateral fibers between CA3 neurons. This creates not only a highly interconnected net but also excitable, which could make it especially susceptible, regardless of the time of day of injury. Nevertheless, this is the first report of variation in susceptibility in the hippocampal subregions, depending on the time at which a TBI is induced. Moreover, depending on the light–dark cycle, pathological changes may be minor when TBI occurs during the dark phase. This effect could be physiologically explained as circadian variations of the expression of pro-inflammatory factors that cause a diurnal difference in the inflammatory response in the CNS (Fonken et al., 2015; Martínez-Tapia et al., 2020).

Numerous studies show that there is diurnal variation in the presentation of acquired brain damage as in the onset of cerebral vascular events (Raj et al., 2015; Ripamonti et al., 2017). In animal models of ischemia, a time-dependent variation in the

damage caused by ischemia. Our data are in line with those reported by Beker et al. (2018), who found less severe neuronal damage, infarct volume, brain swelling, and neurological scores with increased neuronal survival in animals subjected to ischemia during darkness compared to the early light period. However, our data are not in line with those of Vinall et al. (2000), who found more damage at the end of the dark period. In the case of TBI, it is clear that the time of occurrence of this event depends on the activities of the subjects. However, recognizing that there is a differential response depending on the time of occurrence and identifying the systems involved in this response, will provide a novel approach to treat TBI (Martínez-Vargas et al., 2019).

CONCLUSION

In conclusion, our results indicate that circadian characteristics of the microenvironment in the area at which TBI occurs are important and influence the outcome of sensorimotor functions. It is important to conduct more experiments on the cellular and molecular characteristics of the microenvironment at time of TBI. The variation in the excitatory and inhibitory neurotransmitters and their receptors, the immunological function of the microglia and astrocytes, and oxidative stress could be main factors that determining the degree of damage or tissue preservation after TBI. However, we consider that our results and published literature corroborate our hypothesis.

LIMITATIONS

Our results show that the morphological damage induced by TBI depends on the phase of the light-dark cycle in which it occurs. Furthermore, we found that the damage in the perilesional zone is correlated with behavioral performance, less morphological damage, and better behavioral performance in rats that experienced a TBI during the dark hours compared with those injured during the light hours. Nevertheless, we consider that further research is needed on TBI and diurnal variation, and we are conscious that the findings on this study have to be seen in the light of some limitations. We performed the TBI model in the motor cortex. However, we consider the hippocampus a structure in which we could analyze the extent of secondary damage. We believe that memory tests could offer us a more comprehensive approach to hippocampal behavior after trauma and not just histopathological evaluation. We analyzed the hippocampus because it is a structure that is very susceptible to damage from almost any TBI, and given its functions, it is important to analyze the changes it undergoes. In the future, we consider performing an analysis using memory tests to get a better understanding of our results. However, these tests go beyond this paper's scope since they are very time-consuming and require a more in-depth analysis.

Indeed, we are aware that our findings do not offer an explanatory mechanism for the differences we found. We have not analyzed the neurotransmitter systems involved, and whether the hormonal and immune responses are participating in this

diurnal variation in the damage-neuroprotection balance. Our future works will focus on these mechanisms, mainly on the difference of the neuroinflammatory response of the microglia, as we highlighted in a previous review published by our group (Martínez-Tapia et al., 2020). While it is true that there is still scope for investigation, the limitations of this research point toward topics to be addressed in the future.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (project, 018/2016; approved April 05, 2016).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RJM-T performed the anesthesia of animals and the behavioral experiments. FE-R induced the TBI. TGL-A processed and obtained the brains. VR-M and AP-T processed and stained the tissue sections. AP-T made the histopathological sections. AB-M, SG-V, and PU-M did the cell counting in all tissue sections. LN performed the statistical analysis. RJM-T and LN designed the project. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This project received support from PAPIIT: IN223417 and IN228320.

ACKNOWLEDGMENTS

RJM-T is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACyT fellowship 594665. We also would like to thank Daniel Gutiérrez Castañeda and Evelyn Pulido Camarillo for their help with the histological technique, and Mercedes Graciela Porras Villalobos for assistance with cell counting, Prof. Norma Bernal González and Francisco Estrada Bernal for the drawings of the brain and Editage (www.editage.com) for English language editing.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2020.564992/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Anderson, K. J., Miller, K. M., Fugaccia, L., and Scheff, S. W. (2005). Regional distribution of Fluoro-Jade B staining in the hippocampus following brain injury. *Exp. Neurol.* 193, 125–130. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.11.025
- Appel, J. R., Ye, S., Tang, F., Sun, D., Zhang, H., Mei, L., et al. (2018). Increased microglial activity, impaired adult hippocampal neurogenesis, and depressive-like behavior in microglial VPS35-depleted mice. *J. Neurosci.* 38, 5949–5968. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3621-17.2018
- Armstrong, R. C., Mierzwa, A. J., Marion, C. M., and Sullivan, G. M. (2016). White matter involvement after TBI: clues to axon and myelin repair capacity. *Exp. Neurol.* 275, 328–333. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.02.011
- Beker, M. C., Caglayan, B., Yalcin, E., Caglayan, A. B., Turkseven, S., Gurel, B., et al. (2018). Time-of-day dependent neuronal injury after ischemic stroke: implication of circadian clock transcriptional factor Bmal1 and survival kinase AKT. *Mol. Neurobiol.* 55, 2565–2576. doi: 10.1007/s12035-017-0524-4
- Brooks, G. A., and Martin, N. A. (2015). Cerebral metabolism following traumatic brain injury: new discoveries with implications for treatment. *Front. Neurosci.* 8:408. doi: 10.3389/fnins.2014.00408
- Burke, J. F., Wolfe, R. R., Mullany, C. J., Mathews, D. E., and Bier, D. M. (1979). Glucose requirements following burn injury. Parameters of optimal glucose infusion and possible hepatic and respiratory abnormalities following excessive glucose intake. *Ann. Surg.* 190, 274–285. doi: 10.1097/0000658-197909000-00002
- Crane, A. T., Fink, K. D., and Smith, J. S. (2012). The effects of acute voluntary wheel running on recovery of function following medial frontal cortical contusions in rats. *Restor. Neurol. Neurosci.* 30, 325–333. doi: 10.3233/RNN-2012-120232
- Dabrowski, G. P., and Rombeau, J. L. (2000). Practical nutritional management in the trauma intensive care unit. *Surg. Clin. North Am.* 80, 921–932. doi: 10.1016/s0039-6109(05)70105-5
- Eierud, C., Craddock, R. C., Fletcher, S., Aulakh, M., King-Casas, B., Kuehl, D., et al. (2014). Neuroimaging after mild traumatic brain injury: review and meta-analysis. *Neuroimage Clin.* 4, 283–294. doi: 10.1016/j.nicl.2013.12.009
- Estrada-Rojo, F., Morales-Gomez, J., Coballase-Urrutia, E., Martínez-Vargas, M., and Navarro, L. (2018). Diurnal variation of NMDA receptor expression in the rat cerebral cortex is associated with traumatic brain injury damage. *BMC Res. Notes* 11:150. doi: 10.1186/s13104-018-3258-0
- Farr, T. D., and Whishaw, I. Q. (2002). Quantitative and qualitative impairments in skilled reaching in the mouse (*Neurospiza musculus*) after a focal motor cortex stroke. *Stroke* 33, 1869–1875. doi: 10.1161/01.str.0000020714.48349.4e
- Faul, M., Xu, L., Wald, M. M., and Coronado, V. G. (2010). *Traumatic Brain Injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations and Deaths 2002–2006*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention.
- Finnanger, T. G., Skandsen, T., Andersson, S., Lydersen, S., Vik, A., and Indredavik, M. (2013). Differentiated patterns of cognitive impairment 12 months after severe and moderate traumatic brain injury. *Brain Inj.* 27, 1606–1616. doi: 10.3109/02699052.2013.831127
- Fonken, L. K., Frank, M. G., Kitt, M. M., Barrientos, R. M., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2015). Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock. *Brain Behav. Immun.* 45, 171–179. doi: 10.1016/j.bbi.2014.11.009
- Garman, R. H. (2011). Histology of the central nervous system. *Toxicol. Pathol.* 39, 22–35. doi: 10.1177/0192623310389621
- GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators (2019). Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 18, 56–87. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30499-X
- Giza, C. C., and Hovda, D. A. (2014). The new neurometabolic cascade of concussion. *Neurosurgery* 75(Suppl. 4), S24–S33. doi: 10.1227/NEU.0000000000000505
- Grady, M. S., Charleston, J. S., Maris, D., Witgen, B. M., and Lifshitz, J. (2003). Neuronal and glial cell number in the hippocampus after experimental traumatic brain injury: analysis by stereological estimation. *J. Neurotrauma* 20, 929–941. doi: 10.1089/089771503770195786
- Griffin, P., Dimitry, J. M., Sheehan, P. W., Lananna, B. V., Guo, C., Robinette, M. L., et al. (2019). Circadian clock protein Rev-erba regulates neuroinflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 5102–5107. doi: 10.1073/pnas.1812405116
- Hayashi, Y., Koyanagi, S., Kusunose, N., Takayama, F., Okada, R., Wu, Z., et al. (2013). Diurnal spatial rearrangement of microglial processes through the rhythmic expression of P2Y12 receptors. *J. Neurol. Disord.* 1:120. doi: 10.4172/2329-6895.1000120
- Hehar, H., Yeates, K., Kolb, B., Esser, M. J., and Mychasiuk, R. (2015). Impulsivity and concussion in juvenile rats: examining molecular and structural aspects of the frontostriatal pathway. *PLoS One* 10:e0139842. doi: 10.1371/journal.pone.0139842
- Hunter, A. J., Hatcher, J., Virley, D., Nelson, P., Irving, E., Handigam, S. J., et al. (2000). Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology* 39, 806–816. doi: 10.1016/s0028-3908(99)00262-2
- Jasinska, M., Grzegorzczak, A., Jasek, E., Litwin, J. A., Kossut, M., Barbacka-Surowiak, G., et al. (2014). Daily rhythm of synapse turnover in mouse somatosensory cortex. *Acta Neurobiol. Exp.* 74, 104.s–110.s.
- Jasinska, M., Grzegorzczak, A., Woznicka, O., Jasek, E., Kossut, M., Barbacka-Surowiak, G., et al. (2015). Circadian rhythmicity of synapses in mouse somatosensory cortex. *Eur. J. Neurosci.* 42, 2585–2594. doi: 10.1111/ejn.13045
- Leker, R. R., and Shohami, E. (2002). Cerebral ischemia and trauma—different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res. Rev.* 39, 55–73. doi: 10.1016/s0165-0173(02)00157-1
- Lindner, M. D., Plone, M. A., Cain, C. K., Frydel, B., Francis, J. M., Emerich, D. F., et al. (1998). Dissociable long-term cognitive deficits after frontal versus sensorimotor cortical contusions. *J. Neurotrauma* 15, 199–216. doi: 10.1089/neu.1998.15.199
- Maas, A. I., Stocchetti, N., and Bullock, R. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol.* 7, 728–741. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70164-9
- Mao, H., Elkin, B. S., Genthikatti, V. V., Morrison, B. III, and Yang, K. H. (2013). Why is CA3 more vulnerable than CA1 in experimental models of controlled cortical impact-induced brain injury? *J. Neurotrauma* 30, 1521–1530. doi: 10.1089/neu.2012.2520
- Martínez, E. H. (2011). [Traumatismo Craneoencefálico, Fundamentos de Patología, Fisiopatología Clínica, Diagnóstico Y Tratamiento.], 1st Edn. Mexico: Trillas.
- Martínez-Tapia, R. J., Chavarría, A., and Navarro, L. (2020). Differences in diurnal variation of immune responses in microglia and macrophages: review and perspectives. *Cell Mol. Neurobiol.* 40, 301–309. doi: 10.1007/s10571-019-00736-x
- Martínez-Vargas, M., Estrada-Rojo, F., Tabla-Ramon, E., Navarro-Argüelles, H., Ortiz-Lailzon, N., Hernández-Chávez, A., et al. (2012). Sleep deprivation has a neuroprotective role in a traumatic brain injury of the rat. *Neurosci. Lett.* 529, 118–122. doi: 10.1016/j.neulet.2012.09.037
- Martínez-Vargas, M., Gonzalez-Rivera, R., Soto-Núñez, M., Cisneros-Martinez, M., Huerta-Saquero, A., Morales-Gomez, et al. (2006). Recovery after a traumatic brain injury depends on diurnal variations. Effect of cystatin C. *Neurosci. Lett.* 400, 21–24. doi: 10.1016/j.neulet.2006.02.010
- Martínez-Vargas, M., Morales-Gomez, J., Gonzalez-Rivera, R., Hernandez-Enriquez, C., Perez-Arredondo, A., Estrada-Rojo, F., et al. (2013). Does the neuroprotective role of anandamide display diurnal variations? *Int. J. Mol. Sci.* 14, 23341–23355. doi: 10.3390/ijms141223341
- Martínez-Vargas, M., Porras-Villalobos, M. G., Estrada-Rojo, F., Martínez-Tapia, R. J., Perez-Arredondo, A., Barajas-Martinez, A., et al. (2019). “Neuroprotection, photoperiod and sleep,” in *Traumatic Brain Injury*, ed. Y. Zhou (London: InTechOpen).
- Martínez-Vargas, M., Soto-Núñez, M., Tabla-Ramon, E., Solis, B., Gonzalez-Rivera, R., Perez-Arredondo, A., et al. (2014). Cystatin C has a dual role in post-traumatic brain injury recovery. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 5807–5820. doi: 10.3390/ijms15045807
- Menon, K. D., Schwab, K., Wright, D. W., Maas, A. I., and Demographics and Clinical Assessment Working Group of the International and Interagency Initiative toward Common Data Elements for Research on Traumatic Brain Injury and Psychological Health (2010). Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 91, 1637–1640. doi: 10.1016/j.apmr.2010.05.017
- Moineau, C., Neveu, N., Royo, N., Genthon, C., Marchand-Verrecchia, C., Plotkine, M., et al. (2005). Characterization of the alteration of nutritional state in brain injury induced by fluid percussion in rats. *Intensive Care Med.* 31, 281–288. doi: 10.1007/s00134-004-2489-9

- Moller, A. R. (2011). *Anatomy and Physiology of Motor Systems. In: Intraoperative Neurophysiological Monitoring*. New York, NY: Springer.
- Namdar, I., Feldman, R., Glazer, S., Meninger, L., Shlobin, N. A., Rubovitch, V., et al. (2020). Motor effects of minimal traumatic brain injury in mice. *J. Mol. Neurosci.* 70, 365–377. doi: 10.1007/s12031-019-01422-9
- Naseri Kouzehgarani, G., Bothwell, M. Y., and Gillette, M. U. (2020). Circadian rhythm of redox state regulates membrane excitability in hippocampal CA1 neurons. *Eur. J. Neurosci.* 51, 34–46. doi: 10.1111/ejn.14334
- Neumann, M., Wang, Y., Kim, S., Hong, S. M., Jeng, L., Bilgen, M., et al. (2009). Assessing gait impairment following experimental traumatic brain injury in mice. *J. Neurosci. Methods* 176, 34–44. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.08.026
- O'Neill, J. S., and Feeney, K. A. (2014). Circadian redox and metabolic oscillations in mammalian systems. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 2966–2981. doi: 10.1089/ars.2013.5582
- Ozolins, B., Aimers, N., Parrington, L., and Pearce, A. J. (2016). Movement disorders and motor impairments following repeated head trauma: a systematic review of the literature 1990–2015. *Brain Inj.* 30, 937–947. doi: 10.3109/02699052.2016.1147080
- Paxinos, G., and Watson, C. (1998). *The Rat Brain Stereotaxic Coordinates*. London: Academic Press.
- Raj, K., Bhatia, R., Prasad, K., Srivastava, M. V. P., Vishnubhatla, S., and Bhushan Singh, M. B. (2015). Seasonal differences and circadian variation in stroke occurrence and stroke subtypes. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis* 24, 10–16. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2014.07.051
- Ripamonti, L., Riva, R., Maioli, F., Zenesini, C., and Proccianti, G. (2017). Daily variation in the occurrence of different subtypes of stroke. *Stroke Res. Treat.* 2017:9091250. doi: 10.1155/2017/9091250
- Rodgers, K. M., Deming, Y. K., Bercum, F. M., Chumachenko, S. Y., Wieseler, J. L., Johnson, K. W., et al. (2014). Reversal of established traumatic brain injury-induced, anxiety-like behavior in rats after delayed, post-injury neuroimmune suppression. *J. Neurotrauma*. 31, 487–497. doi: 10.1089/neu.2013.3090
- Roome, R. B., and Vanderluit, J. L. (2015). Paw-dragging: a novel, sensitive analysis of the mouse cylinder test. *J Vis Exp.* 98, e52701. doi: 10.3791/52701
- Rosenbaum, S. B., and Lipton, M. L. (2012). Embracing chaos: the scope and importance of clinical and pathological heterogeneity in mTBI. *Brain Imaging Behav.* 6, 255–282. doi: 10.1007/s11682-012-9162-7
- Savchenko, V. L., Nikonenko, I. R., Skibo, G. G., and McKanna, J. A. (1997). Distribution of microglia and astrocytes in different regions of the normal adult rat brain. *Neurophysiology* 29, 343–351. doi: 10.1007/BF02463354
- Stenvers, D. J., van Dorp, R., Foppen, E., Mendoza, J., Opperhuizen, A. L., Fliers, E., et al. (2016). Dim light at night disturbs the daily sleep-wake cycle in the rat. *Sci. Rep.* 6:35662. doi: 10.1038/srep35662
- Takayama, F., Hayashi, Y., Wu, Z., Liu, Y., and Nakanishi, H. (2016). Diurnal dynamic behavior of microglia in response to infected bacteria through the UDP-P2Y6 receptor system. *Sci. Rep.* 6:30006. doi: 10.1038/srep30006
- Tan, Y., Yuan, Y., and Tian, L. (2020). Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol. Psychiatry*. 25, 351–367. doi: 10.1038/s41380-019-0609-8
- Tennant, K. A., Asay, A. L., Allred, R. P., Ozburn, A. R., Kleim, J. A., and Jones, T. A. (2010). The vermicelli and capellini handling tests: simple quantitative measures of dexterous forepaw function in rats and mice. *J. Vis. Exp.* 41:2076. doi: 10.3791/2076
- Tsenter, J., Beni-Adani, L., Assaf, Y., Alexandrovich, A. G., Trembovler, V., and Shohami, E. (2008). Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *J. Neurotrauma* 25, 324–333. doi: 10.1089/neu.2007.0452
- Tsuda, S., Hou, J., Nelson, R. L., Wilkie, Z. J., Mustafa, G., Sinharoy, A., et al. (2016). Prolonged hippocampal cell death following closed-head traumatic brain injury in rats. *Neuroreport* 27, 724–729. doi: 10.1097/WNR.0000000000000598
- Verdugo-Díaz, L., Estrada-Rojo, F., Garcia-Espinoza, A., Hernandez-Lopez, E., Hernandez-Chavez, A., Guzman-Urbe, C., et al. (2017). Effect of intermediate-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on recovery following traumatic brain injury in rats. *Biomed. Res. Int.* 2017:4540291. doi: 10.1155/2017/4540291
- Vinall, P. E., Kramer, M. S., Heinel, L. A., and Rosenwasser, R. H. (2000). Temporal changes in sensitivity of rats to cerebral ischemic insult. *J. Neurosurg.* 93, 82–89. doi: 10.3171/jns.2000.93.1.0082
- Zhang, Z., Wang, H. J., Wang, D. R., Qu, W. M., and Huang, Z. L. (2017). Red light at intensities above 10 lx alters sleep-wake behavior in mice. *Light Sci. Appl.* 6:e16231. doi: 10.1038/lsa.2016.231

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Martinez-Tapia, Estrada-Rojo, Lopez-Aceves, Rodríguez-Mata, Perez-Torres, Barajas-Martinez, Garcia-Velasco, Ugalde-Muñiz and Navarro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Differences in Diurnal Variation of Immune Responses in Microglia and Macrophages: Review and Perspectives

Ricardo J. Martínez-Tapia^{1,3} · Chavarría Anahí² · Navarro Luz¹

Received: 20 May 2019 / Accepted: 7 September 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Biological rhythms, especially those that last close to 24 h, better known as circadian rhythms, are highly regulated phenomena, maintained throughout evolution in various organisms which allow organisms to predict, prepare for, and adapt to environmental changes. One of these phenomena that exhibit biological rhythms is the immune response to external agents. Immune cells (neutrophils, lymphocytes, macrophages, among others), as well as their mediators such as cytokines and chemokines, undergo variations in tissue and blood concentrations during the day. These rhythms are still being elucidated in microglia, the resident macrophages of the central nervous system, but since these cells share a common origin with peripheral macrophages, they are expected to behave similarly. In this review, we will discuss the possible differences in the responses between peripheral macrophages and microglia, their relationship with the circadian clock, and whether these rhythms can influence therapeutic choices.

Keywords Circadian rhythm · Immune clock · Macrophages · Microglia

Introduction

Biological rhythms are essential properties of almost all living organisms from bacteria and fungi to plants and animals (Bhadra et al. 2017). These rhythms are considered to be the result of evolutionary pressures and natural selection and enable organisms to predict, prepare for, and adapt to environmental changes through synchronizers, better known as *zeitgebers* (a German word meaning “time giver”). *Zeitgebers* are perceived by the organism, responding to physiological and behavioral changes by altering hormone levels, body temperature, metabolism, and even cognitive processes. However, it is essential to note that these rhythms

are expressed even in the absence of environmental changes. The *zeitgebers* only synchronize the circadian clock. The light–dark cycle is one of the most important and best-studied *zeitgeber*; changes in the intensity of light are detected by a series of hierarchically organized structures found at the hypothalamus (Terzibasi-Tozzini et al. 2017). However, the light–dark cycle is not the only kind of *zeitgeber*, since the organism can also receive synchronization stimuli through food intake (Sahar and Sassone-Corsi 2012; Morton et al. 2014), changes in temperature (Rensing and Ruoff 2002), and physical activity (Schibler and Sassone-Corsi 2002). One of the biological functions regulated by the circadian clock is the immune system (IS) (Scheiermann et al. 2013, 2018). In this review, we focus on the responses of microglia and peripheral macrophages and their relationship with the circadian clock.

✉ Navarro Luz
Inavarro@unam.mx

¹ Neuroendocrinology Laboratory, Department of Physiology, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Coahuacán, Mexico

² Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

³ Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, División de Estudios de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

The Central and Peripheral Clocks

In mammals, the changes in light and darkness are detected in the retina, and then the retinohypothalamic tract (RHT) transmits this information to the “central clock”, a region located in the hypothalamus known as the suprachiasmatic nucleus (SCN). SCN is made up of about 10,000 neurons

in mice and up to 50,000 in humans (Videnovic et al. 2014). SCN neurons and virtually all cells of an organism have a molecular clock consisting of a mechanism of transcriptional-translational retro control. The main circuit of such system is regulated by the transcription factors aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (ARNTL), also known as Brain and Muscle ARNT-Like 1 (BMAL1), as well as the circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK). When heterodimerized, both transcription factors bind to the E-box sequences found in the promoters of the so-called clock-controlled genes (CCGs). Among these genes are the proteins period (PER) 1–3, cryptochrome (CRY) 1–2, and nuclear receptors Rev-Erb α and Rora. PER and CRY inactivate the proteins BMAL1 and CLOCK, generating a transcriptional control cycle of 24 h. Importantly, CCGs also code for a large number of proteins and can generate the physiological rhythms of metabolism and behavior (Takahashi 2017).

On the other hand, peripheral oscillators are usually synchronized with the SCN and have been characterized in various tissues such as the liver (Lamia et al. 2008), kidney (Solocinski and Gumz 2015), skin (Matsui et al. 2016), heart (Durgan and Young 2010), and in immune system cells such as lymphocytes (Druzdz et al. 2017) and macrophages (Keller et al. 2009). This synchronization of the central clock with the peripheral organs occurs through the hypothalamic–pituitary–adrenal efferent pathways and the autonomic nervous system (Curtis et al. 2014).

Circadian Rhythms of the Immune System

The IS differentiates the usual from the strange and protects the organism from harmful agents that come from the environment, such as pathogens (bacteria, viruses, fungi, and parasites) and foreign substances. The IS is divided into two large arms, the innate IS (IIS) and the adaptive (AIS). The IIS is considered the first line of defense that includes physical barriers (skin and mucous membranes), different cell types like nuclear polymorphs (neutrophils, eosinophils, and basophils), mononuclear cells (monocytes, macrophages, and lymphocytes), and soluble factors (complement system and mediators of inflammation, such as cytokines and chemokines).

The IIS allows a rapid, non-specific defense response mainly directed against pathogens or necrotic cells. This is achieved by recognizing molecules denominated as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), such as lipopolysaccharides (LPS), as well as damage-associated molecular patterns (DAMPs), such as the high-mobility group box 1 (HMBG1) (Chen and Nuñez 2010).

Finally, the IIS is capable of interacting with and activating the other major branch: the AIS. This is characterized

by a slow, antigen-specific response mediated by T and B lymphocytes that proliferate and differentiate into the effector population after antigen presentation. Thus, the complete elimination of pathogens occurs, as well as the generation of mechanisms of immunological memory (Parkin and Cohen 2001; Cermakian et al. 2013; Labrecque and Cermakian 2015).

It is currently known that the magnitude of IS response could be controlled by circadian signals that could influence the trafficking of immune cells, the host–pathogen interaction, or the activation of innate and adaptive immunity. In mice, a rhythmic pattern of leukocyte recruitment has been described, and more significant traffic of immune cells to tissues was observed during the activity period (dark phase). For example, neutrophils, i.e., cells that are attracted to inflamed tissues early on in the immune reaction and act through phagocytosis and the secretion of antimicrobial substances, vary their concentration in the blood throughout the day (Scheiermann et al. 2012). In humans, this circadian variation has been related to the expression of CLOCK molecular proteins. Although neutrophils express CLOCK genes such as *Per1*, *Dbp*, and *Rev-erba*, the levels of PER2 and BMAL1 were undetectable and minimal, respectively. Therefore, it was concluded that it might be systemic mechanisms and not the autonomous self-oscillator of the cells that determine the diurnal changes in the effector activity of peripheral neutrophils (Ella et al. 2016).

However, with the administration of a pro-inflammatory stimuli such as LPS, the relative expression of clock molecules like *Clock*, *Per3*, *Cry1*, and *Cry2* in peripheral blood leukocytes decreased by 80–90%, suggesting that endotoxin is a potent entrainer of the circadian clock network in circulating inflammatory cells (Haimovich et al. 2010). Furthermore, after trauma or during inflammatory disease, neutrophil migration to tissues is significantly influenced by the endogenous rhythms of endothelial cells due to the circadian expression of adhesion proteins (Scheiermann et al. 2012). This variation may have evolved since phagocytes greatly improve the response to pathogens during periods of activity, during which injuries and infections of microorganisms are more likely to occur (Casanova-Acebes et al. 2013).

Other cellular components of the IIS are macrophages, innate immune cells derived from monocytes, and long-term residents of various tissues. Although initially described as mainly phagocytic cells, macrophages participate in multiple processes and mediate inflammatory phenomena, regulate T lymphocyte activation through antigen presentation, and play a role in tissue repair and regeneration (Snyder et al. 2016). In this manuscript, we describe the functions of these cells in relation to the molecular clock.

Finally, another component of the IIS that varies through the day is soluble factors like cytokines and chemokines. In healthy humans, serum levels of interleukin (IL)-1, IL-6,

and soluble IL-2 receptors peak at 1–4 am (rest period) and are lower to 8–10 am (active period) (Petrovsky 2001). In a cell culture of peritoneal exudate cells (PECs) of mice, the secretion of cytokines like IL-6 and IL-12 (p40) and chemokines such as CXCL1, CCL5, and CCL2 showed a circadian response to LPS administered in an intraperitoneal (i.p.) manner. The highest response to LPS was observed at the transition of the rest and active phases, at circadian time 12 (CT12) (Gibbs et al. 2012).

Circadian Variation in the Immune Response of Macrophages

Studies in mice showed that the ability of peritoneal macrophages (PM) to initiate a defense cascade is strongly regulated by an intrinsic circadian clock. For example, ex vivo PM showed expression of canonical clock genes such as *Bmal1*, *Cry1-2*, *Per1-3*, and *Rev-erba*. However, with the administration of LPS, specifically, pro-inflammatory cytokine such as TNF- α and IL-6 production is determined by the circadian phase of the macrophage clock rather than by systemic circadian modulators such as cortisol levels (Keller et al. 2009). Another study reported that the ability of PM to phagocytize is higher during the day as compared to the night, and the transcription of mRNA pro-inflammatory cytokines and chemokines on it also have the same rhythmicity (Hayashi et al. 2007).

The close relationship of the immune response of macrophages with the circadian clock was affirmed when the function of the *Per2* gene was shown to be linked to the expression of toll-like receptor-9 (TLR9) in mice. In macrophages, *Tlr9* mRNA expression showed a daily rhythm that peaked at *zeitgeber* time 11 (ZT11), the *Per2* mutation causes alterations, such as a decrease in TLR9 expression and a lower secretion of TNF- α and IL-12 after challenge with a ligand for TLR9 (Silver et al. 2012). Subsequently, ex vivo studies of bone marrow-derived macrophages of mice having a complete deletion of the *Arntl*^{-/-} gene (also known as *Bmal1*) showed that it plays an essential role in the overall control of inflammatory gene regulation. This occurs by presenting a more significant response and prolonged activation of inflammatory genes activated by TLR4 as compared to its control group (Oishi et al. 2017). These data correlated with a previous study in which macrophages with deletion of the *Arntl*^{-/-} gene displayed a higher production of cytokines, especially of TNF- α and IL-6 (Curtis et al. 2015).

A study focusing on PECs, specifically macrophages characterized by the surface expression of F4/80 and CD11b, found that the nuclear receptor REV-ERB α , which plays a central role in the control of circadian expression of *Bmal1*, is the main one involved in the modulation of circadian

control of the IIS. In an initial experiment, LPS i.p. induced an increase in the synthesis of cytokines IL-6 and IL-12 with a peak during the transition to the active phase (CT12) as compared with the transition to resting phase (CT0) in control mice. However, in a knockout mouse with a macrophage-specific *Bmal1*^{-/-}, this time-dependent effect on the magnitude of the LPS response was lost. In another experiment, WT mice exposed to LPS i.p. showed higher serum concentrations of IL-6 at CT12 compared to CT0. However, in the Rev-erb gene (*rev-erba*^{-/-}) knockout mice, this difference was lost. The marked discrepancy in the cytokine secretion in both experiments demonstrated the essential role of the molecular clock on immune response rhythmicity (Gibbs et al. 2012).

Finally, in an infection model of *Leishmania major*, the authors showed for the first time that the circadian clock of mice bone marrow-derived macrophages is involved in the susceptibility of infection to this parasite. When *Bmal1*^{-/-} knockout mice were infected, no circadian variations were observed in the parasite load or the number of infected macrophages. In contrast, in WT animals it was found that parasitic load, together with the number of CD206⁻ macrophages and CD11b⁺ neutrophils, was higher during the active phase (CT15), (Kiessling et al. 2017).

Microglia

Microglia are the resident macrophages of the central nervous system (CNS) and represent near 20% of the total number of cells in the CNS (Lawson et al. 1990). These cells are distributed through all regions of the brain, and its density varies depending on the area, ranging from only 5% in the corpus callosum or up to 12% in the substantia nigra (Lawson et al. 1990; Savchenko et al. 1997; Tremblay et al. 2011). For a long time, it was believed that microglia played a “static” role within the normal physiology of the CNS; however, in this apparent state of rest it plays a highly dynamic function by continuously sampling their microenvironment with long protrusions and a variety of surface receptors (Nimmerjahn et al. 2005). It is currently known that microglia maintain CNS homeostasis by regulating synapses depending on neuronal activity and the simultaneous interaction with neurons and astrocytes (Tremblay et al. 2011). Actually, microglial cells collaborate during fetal development, childhood, and puberty, thereby being responsible for “synaptic pruning” and the production of neurotrophic factors (Wu et al. 2015; Kierdorf and Prinz 2017).

Furthermore, microglia can actively sense any possible signs of damage coming mainly from neurons and are responsible for initiating the innate immune response to aggression from either microorganism (bacteria, viruses,

etc.), direct acute damage (trauma or cerebral vascular events) or neurodegenerative mechanisms (Brown and Neher 2014; Butovsky et al. 2016; Wolf et al. 2017). For its activation, microglia require a specific pathological stimulus that could generate changes in its morphology as described in several models, for example, in prion disease (Vincenti et al. 2015), traumatic brain injury (TBI) (Morrison et al. 2017), and stroke (Heindl et al. 2018), among others. Therefore, microglia respond to these stimuli by synthesizing a broad spectrum of chemokines, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, and other mediators. In fact, depending of the activation profile, microglia can be divided into M1 (classical profile) and M2 (alternative), the latter of which can be further differentiated into three subsets: (1) M2a, focused on repair and regeneration; (2) M2b, an immunoregulatory phenotype; and (3) M2c, an acquired-deactivating phenotype (Kabba et al. 2018).

Circadian Rhythms in Microglia

Although the works of this CNS resident macrophage regarding the presence of an intrinsic biological clock are recent, they have yielded exciting results (Chi-Castañeda and Ortega 2018). For example, Hayashi et al. (2013a) found that the isolated microglia of the cerebral cortex of mice exhibited variations throughout the day in its morphology, thereby finding a greater branching during the darkness, which subsequently decreased during the light phase; also these changes were associated with circadian variations because it was preserved in conditions of constant darkness. These morphological variations were related to the cycles of expression of clock proteins and the induction of purinergic receptors, specifically the P2Y₁₂ type (P2Y₁₂R), a G_{i/o}-coupled ATP receptor exclusively expressed in microglia in CNS (Tozaki-Saitoh et al. 2012), which activate a downstream signaling cascade that could reorganize the cytoskeleton (Hristovska and Pascual 2016). Hayashi et al. generated *clock*-mutant mice and observed that diurnal morphological changes of microglia and the relative mRNA levels of P2Y₁₂R were abolished, both in normal light/dark and under constant-dark conditions (Hayashi et al. 2013a).

In other research, Takayama et al. reproduced the diurnal variation of cortical microglia, they measured the mean total length and the mean number of branch points and found that the significance of both was greater at ZT14 than ZT2. However, in a second experiment, focal administration of *Porphyromona gingivalis* to the somatosensory cortex resulted in a greater significant microglial process extension at ZT2 than at ZT14. Finally, the authors relate the microglial expression of P2y₆R, a G_{q/11} protein that regulates the intracellular Ca²⁺ store and is activated by uridine triphosphate and UDP, with the diurnal variations since a pharmacological blockade

of this receptor caused the microglial process extensions to be significantly attenuated. Furthermore, they showed that the promoter region of the gene *P2ry6* of P2y₆R contains a RORE site, which is the target of Rev-erb α . Therefore, Rev-erb α could suppress the expression of *P2ry6* during the active phase of the mouse (dark phase) (Takayama et al. 2016).

In addition, the molecular machinery of the cortical microglia clock generates the circadian expression of cathepsin S (CatS) (a specific lysosomal cysteine protease). The levels of expression of CatS are low during the light period, correlating with a decrease in the size of the dendritic spines and the synaptic strength and, by elevating the expression of CatS during the dark phase, the dendritic spines and the synaptic strength increase (Hayashi et al. 2013b). Interestingly, CatS has been related to the part of the adaptive immune response that contributes to antigenic presentation, for example, in the formation of specific peptides against foreign proteins (Hsieh et al. 2002) and in the degradation of the invariant chaperone chain associated with the major histocompatibility complex (MHC) class II (Honey and Rudensky 2003; Clark and Malcangio 2013).

Finally, genes of pro-inflammatory factors (IL-1 β , TNF- α , and IL-6) in rat hippocampal microglia showed rhythmicity throughout the day. When LPS was administered during the light phase, there was a significant expression of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 of both, the mRNA and protein. In contrast, during the dark phase, the levels of these cytokines were lower regardless of the concentrations of LPS administered. This response seems to be independent of glucocorticoids, since, despite adrenalectomy and the absence of circulating corticosteroids, the circadian rhythms in the microglia were maintained (Fonken et al. 2015).

Summary of the articles discussed is presented in Table 1, and comparison throughout the day of the response of both microglia and macrophages is shown in Fig. 1.

Are There Different Variations in Microglia and Macrophages?

The immune response varies throughout the day and depends on the molecular machinery of the circadian clock (Scheiermann et al. 2013, 2018). Apparently, this physiological variation correlates with immune response, the susceptibility to different agents throughout the day, such as bacteria, and the prognosis after the immune challenge. Extensive reviews describe that the transition from the rest phase to active phase is associated with a higher susceptibility and induction of pro-inflammatory cytokines, as compared to the transition from active phase to rest phase where the susceptibility is lower and with a lower induction of pro-inflammatory cytokine synthesis (Curtis et al. 2014; Geiger et al. 2015).

Table 1 Comparison of different functions in light and dark period macrophages and microglia in murine models

Function	Period	Macrophages	Microglia
Cytokine and chemokine synthesis	Light	<ul style="list-style-type: none"> Increased IL-1β, TNF-α, IL-6 and CCL2 in peritoneal macrophages (Hayashi et al. 2007) Increased secretion of TNF-α and IL-6 by spleen macrophages at CT8-CT12 after LPS stimulation (Keller et al. 2009) Higher induction in serum IL-6, IL-12, CCL2, CXCL1 and CCL5 at CT12 after LPS stimulation (Gibbs et al. 2012) 	<ul style="list-style-type: none"> Higher expression at ZT6 of mRNA and protein of IL-1β, TNF-α and IL-6 in hippocampal microglia after LPS stimulation (Fonken et al. 2015) Higher relative gene expression of hippocampal IL-1β and TNF-α 24h after cardiac in the mid-light murine group (Weil et al. 2009)
	Dark	<ul style="list-style-type: none"> Higher serum TNF-α and IL-6 levels at ZT14 after 80 min of LPS application (Guerrero-Vargas et al. 2014) Decreased secretion of TNF-α and IL-6 by spleen macrophages at CT16 after LPS stimulation. (Keller et al. 2009) Lower induction of IL-10 at ZT12 than at ZT0 (Curtis et al. 2015) In adrenalectomized mice TNF-α and IL-6 secretion by spleen macrophages was higher at CT12 after LPS stimulation (Keller et al. 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> Higher expression at ZT16 of protein of IL-10 in unstimulated hippocampal microglia and after LPS stimulation Fonken et al. 2015
Glucocorticoid influence	Light	<ul style="list-style-type: none"> In adrenalectomized mice TNF-α and IL-6 secretion by spleen macrophages was higher at CT12 after LPS stimulation (Keller et al. 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> In rats with adrenalectomy the relative gene expression of IL-1β and TNF-α is higher at ZT6 after LPS stimulation. (Fonken et al. 2015)
Phagocytosis	Dark	<ul style="list-style-type: none"> Increased ability of phagocytosis of peritoneal macrophages (Hayashi et al. 2007) 	No published information available
	Light	No published information available	<ul style="list-style-type: none"> Less branching and length of cell processes in cortical microglia during ZT2 (Hayashi et al. 2013a)
Morphology	Dark	No published information available	<ul style="list-style-type: none"> Cortical microglia respond more to P. gingivalis exposure at ZT2 (Takayama et al. 2016)
	Light	No published information available	<ul style="list-style-type: none"> Cortical microglia has longer cell processes and more branching points at ZT14 (Takayama et al. 2016) Cortical microglia respond more to ATP exposure at ZT14 (Takayama et al. 2016)
Other immune molecules	Light	<ul style="list-style-type: none"> Higher number of CD11b+/CD14+ spleen macrophages at CT8 (Keller et al. 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> Unstimulated hippocampal microglia show higher MHCII levels at ZT6 (Fonken et al. 2015)
	Dark	<ul style="list-style-type: none"> Higher number of inflammatory CD206+ peritoneal macrophages (Kiessling et al. 2017) Higher expression of chemoattractants (<i>Mip2</i>, <i>Mcp1</i>, <i>Mip1α</i>, <i>Mip1β</i> and <i>Tnfα</i>) in peritoneal macrophages after L. major infection (Kiessling et al. 2017) 	

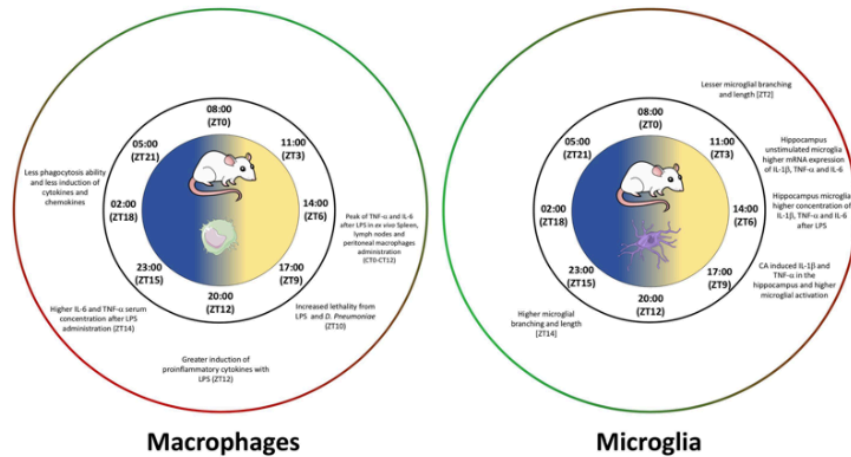


Fig. 1 Comparative immune response between peripheral macrophages and microglia through the day. Several studies highlight the pro-inflammatory immune response of peripheral macrophages during the light–dark transition or in darkness, while microglial studies show this tendency towards daylight hours. ZT is a unit of time based

Guerrero-Vargas et al. showed that intravenous LPS administration at ZT14 (2 h after the beginning of the active phase) induced a higher serum concentration of IL-6 compared to the group with LPS administration at ZT2 (2 h after the beginning of the rest phase) (Guerrero-Vargas et al. 2014). Therefore, it is necessary to consider factors that cause circadian variation in the organism and could influence these variations in immune response; for example, hormones that display typical circadian rhythms, such as growth hormone and prolactin which peak at the rest phase, catecholamines which peak during the active phase or, for example corticosteroids, that in a study with administration of dexamethasone in peripheral oscillators like liver and fibroblast, have been related to a phase-shifting in expression of *Dbp* and *Rev-erba* caused a strong phase delay when it was injected at ZT14 and ZT21 (night phase), whereas injection at ZT1 (light phase) resulted in a phase-advance (Balsalobre et al. 2000). This could explain why the peak at the transition of rest phase to active phase of corticosteroids could be related to a phase-shifting in microglia and macrophages; however, as we previously mentioned, some studies had reported a corticosteroids independent mechanism. Therefore, more studies are necessary to elucidate these mechanisms, considering that there may be several factors that are generating this difference (Fig. 2).

Nevertheless, it is necessary to consider the context of the CNS, which presents structural features of the tissue that differentiate it from the response generated in the rest

of the organism. One such example is the presence of the blood–brain barrier, a morpho-functional structure that separates the CNS from blood and which also presents variations in permeability that depends both on sleep and circadian rhythms (Cuddapah et al. 2019). On the other hand, the glymphatic system was recently described as a glial-dependent perivascular network that subserves a pseudolymphatic function in the brain (Iliff et al. 2012; Plog and Nedergaard 2018). The specific response of the microglia needs to be considered, depending on the time in which an immune challenge is generated, for example, research on CNS of a murine model showed that a lower induction of the pro-inflammatory response during the dark phase is observed compared to the light phase. For example, the hippocampal relative gene expression of IL-1 β and TNF- α was higher in mice exposed to cardiac arrest 6–8 h after turning lights on (mid-light period) than in mice challenged 4–6 h after turning lights off (mid-dark period). These observations correlated with microglial activation that was quantified in different brain areas and found to be higher in the mid-light period compared to the mid-dark period phase (Weil et al. 2009). These results are in agreement with the variations described in the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , and IL-6) in the hippocampus 3 and 24 h after the application of LPS at two different time points (ZT6 and ZT16), thereby showing a greater response during the light phase compared to the dark phase (Fonken et al. 2015). In rats subjected to the unavoidable shock test of the tail and

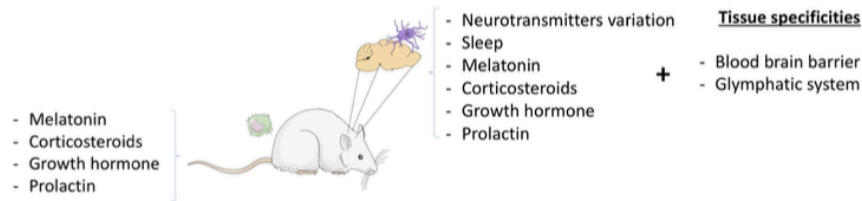


Fig. 2 Factors that can influence the difference in the immune response between macrophages and microglia. The activation peak of macrophages agrees with several studies that indicate that the resting period (i.e., the dark period in humans and the light period in nocturnal rodents) is characterized by maximum levels of pro-inflammatory hormones, such as growth hormone (GH) and prolactin, as well as Th1 or pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 and TNF- α . In addition, the numbers of CD4+ T cells and the ability to respond to LPS are also higher during the rest period. While during the active period (i.e., the light period in humans and the dark period in noc-

turnal rodents), the hypothalamus–hypophysis–adrenal axis turns on and cortisol or corticosterone peaks; also, adrenaline released from the adrenal medulla and noradrenaline released from the sympathetic nerve endings increase. These hormones are anti-inflammatory and shut down the pro-inflammatory response induced during the rest period. Indeed, also IL-10, the major anti-inflammatory cytokine peaks in the active period. All these factors coincide with a lower activation of the macrophages (Besedovsky et al. 2012; Cermakian et al. 2013)

subsequently exposed to LPS, the hippocampal induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) was higher in the subjects tested during the light period than in rats subjected to stress during the dark period (Fonken et al. 2016). Finally, these works suggest that microglia could be generating an immune-regulatory role, by receiving the immune signals coming from the periphery and initiating a greater pro-inflammatory response in the CNS during the period of light compared to the dark period.

Implications and Future Perspectives

Differences between both responses, central and peripheral seem reasonable when considering tissue macrophages in different circumstances; therefore, the immune profile variation throughout the day would not seem surprising. However, the observations that the CNS presents greater susceptibility during the light period compared to the period of darkness due to a more pronounced pro-inflammatory response may be of clinical relevance since brain therapies should consider these circumstances. For example, in our laboratory, we have demonstrated that rats subjected to TBI during the light period present remarkable damage evaluated through neurobehavioral tests and higher mortality in comparison with rats traumatized during the dark period (Estrada-Rojo et al. 2018). These data are consistent with the previously-mentioned studies.

Nevertheless, whether this difference is due to the variation of the immune response in CNS is open to corroboration. However, we hypothesize that it could be the sleep condition that could be generating a microenvironment that promotes the observed gap between microglia and peripheral macrophages, for example, in previous works it has already

been reviewed that the neurons and astrocytes of areas that are involved in the regulation of sleep–wake behavior as hypothalamus, hippocampus, and brain stem and even cortex are immunoreactive for cytokines such as IL-1 β and TNF- α (Imeri and Opp 2009). This pro-inflammatory microenvironment coincides with the onset of susceptibility during the cycle of light in rats, and in turn would explain the works mentioned in this review. Finally, future experiments will need to consider another variable, the glymphatic system that has a central role in brain clearance and is functional during sleep (Iliff et al. 2012). Other factors to be considered are the vagus nerve regulation of peripheral immune response, melatonin production, and the effects of sleep deprivation among others.

Although macrophage-based cell therapies are novel and promising in the treatment of different pathologies, for example, brain ischemia (Kanazawa et al. 2017), or in the context of an acquired infection or injury, the treatment should take into consideration the time of day that the event occurred. This is because the microenvironment generated by microglia or macrophages is affected by this factor when injury or infection occurs and could determine the levels of pro-inflammatory response, which might affect prognosis.

Conclusion

There is plenty of evidence in the literature suggesting a difference in the response between peripheral macrophages and microglia in CNS throughout the day. In this review, we presented the most representative works oriented to the variation of the immune response in the periphery and CNS, and its relation to macrophages. However, we feel that more studies are necessary to elucidate this hypothesis, and if this

is confirmed, it could imply significant repercussions on the research of various diseases. On the other hand, the time of the day that injury or infection occurs, and whether it occurs in the CNS or the periphery should be considered in future therapies since the outcome may vary.

Acknowledgements Ricardo Jesús Martínez Tapia is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 594665 from CONACYT. Also, the project received support from PAPIIT: IN223417. We want to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

Author Contributions RJMT, AC, and LN designed the paper; RJMT wrote the paper and designed the figures; and AC and LN reviewed the manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors report no conflict of interest.

References

- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289(5488):2344–2347
- Besedovsky L, Lange T, Born J (2012) Sleep and immune function. *Pflugers Arch* 463(1):121–137
- Bhadra U, Thakkar N, Das P, Pal Bhadra M (2017) Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human. *Sleep Med* 35:49–61
- Brown GC, Neher JJ (2014) Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci* 15(4):209–216
- Butovsky O, Madore C, Weiner H (2016) Chapter 13: Microglial Biology and Physiology. In: Ikezu T, Gendelman HE (eds) *Neuroimmunopharmacology*, 2nd edn. Springer, New York, pp 167–200
- Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chèvre R, A-González N et al (2013) Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 153(5):1025–1035
- Cermakian N, Lange T, Golombek D, Sarkar D, Nakao A, Shibata S, Mazzoccoli G (2013) Crosstalk between the circadian clock circuitry and the immune system. *Chronobiol Int* 30(7):870–888
- Chen GY, Nuñez G (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10(12):826–837
- Chi-Castañeda D, Ortega A (2018) Glial cells in the genesis and regulation of circadian rhythms. *Front Physiol* 9:88
- Clark AK, Malcangio M (2013) Microglial signaling mechanisms: Cathepsin S and Fractalkine. *Exp Neurol* 234(2):283–292
- Cuddapah VA, Zhang SL, Sehgal A (2019) Regulation of the blood–brain barrier by circadian rhythms and sleep. *Trends Neurosci* 42(7):500–510
- Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O’Neil LAJ (2014) Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* 40:178–186
- Curtis AM, Fagundes CT, Tang G, Palsson-McDermott EM, Wochal P, McGettrick AF et al (2015) Circadian control of innate immunity in macrophages by miR-155 targeting Bmal1. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(23):7231–7236
- Druz D, Matveeva O, Ince L, Harrison U, He W, Schmal C et al (2017) Lymphocyte circadian clocks control lymph node trafficking and adaptive immune responses. *Immunity* 46(1):120–132
- Durgan DJ, Young ME (2010) The cardiomyocyte circadian clock: emerging roles in health and disease. *Circ Res* 106(4):647–658
- Ella K, Csépanyi-Kömi R, Káldi K (2016) Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain Behav Immun* 57:209–221
- Estrada-Rojo F, Morales Gomez J, Coballase-Urrutia E, Martínez-Vargas M, Navarro L (2018) Diurnal variation of NMDA receptor expression in the rat cerebral cortex is associated with traumatic brain injury damage. *BMC Res Notes* 11:150
- Fonken LK, Frank MG, Kitt MM, Barrientos RM, Watkins LR, Maier SF (2015) Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock. *Brain Behav Immun* 45:171–179
- Fonken LK, Weber MD, Daut RA, Kitt MM, Frank MG, Watkins LR, Maier SF (2016) Stress-induced neuroinflammatory priming is time of day dependent. *Psychoneuroendocrinology* 66:82–90
- Geiger SS, Fagundes CT, Siegel RM (2015) Chrono-immunology: progress and challenges in understanding links between the circadian and immune systems. *Immunology* 146(3):349–358
- Gibbs JE, Blaikley J, Beesley S, Matthews L, Simpson KD, Boyce SH et al (2012) The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(2):582–587
- Guerrero-Vargas NN, Salgado-Delgado R, del Basualdo M, García J, Guzmán-Ruiz M, Carrera JC et al (2014) Reciprocal interaction between the suprachiasmatic nucleus and the immune system tunes down the inflammatory response to lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 273(1–2):22–30
- Haimovich B, Calvano J, Haimovich AD, Calvano SE, Coyle SM, Lowry SF (2010) In vivo endotoxin synchronizes and suppresses clock gene expression in human peripheral blood leukocytes. *Crit Care Med* 38(3):751–758
- Hayashi M, Shimba S, Tezuka M (2007) Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. *Biol Pharm Bull* 30(4):621–626
- Hayashi Y, Koyanagi S, Kusunose N, Takayama F, Okada R, Wu Z et al (2013a) Diurnal spatial rearrangement of microglial processes through the rhythmic expression of P2Y₁₂ receptors. *J Neurol Disord* 1:120
- Hayashi Y, Koyanagi S, Kusunose N, Okada R, Wu Z, Tozaki-Saitoh H et al (2013b) The intrinsic microglial molecular clock controls synaptic strength via the circadian expression of cathepsin S. *Sci Rep* 3:2744
- Heindl S, Gesierich B, Benakis C, Llovera G, Duering M, Liesz A (2018) Automated morphological analysis of microglia after stroke. *Front Cell Neurosci* 12:106
- Honey K, Rudensky AY (2003) Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3(6):472–482
- Hristovska I, Pascual O (2016) Deciphering resting microglia morphology and process motility from a synaptic prospect. *Front Integr Neurosci* 19:9–73
- Hsieh CS, deRoos P, Honey K, Beers C, Rudensky AY (2002) A role for cathepsin L and cathepsin S in peptide generation for MHC class II presentation. *J Immunol* 168(6):2618–2625
- Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA et al (2012) A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med* 4(147):147
- Imeri L, Opp MR (2009) How (and why) the immune system makes us sleep. *Nat Rev Neurosci* 10(3):199–210
- Kabba JA, Xu Y, Christian H, Ruan W, Chenai K, Xiang Y et al (2018) Microglia: housekeeper of the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol* 38(1):53–71
- Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T, Shimohata T (2017) Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke. *Int J Mol Sci* 18:2135

- Karatsoreos IN, Silver R (2017) Chapter 27 Body Clocks in Health and Disease. In: Michael Conn P (ed) Conn's translational neuroscience. Academic Press, Cambridge, pp 599–615
- Keller M, Mazuch J, Abraham U, Eom GD, Herzog ED, Volk HD et al (2009) A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(50):21407–21412
- Kierdorf K, Prinz M (2017) Microglia in steady state. *J Clin Invest* 127(9):3201–3209
- Kiessling S, Dubeau-Laramée G, Ohm H, Labrecque N, Olivier M, Cermakian N (2017) The circadian clock in immune cells controls the magnitude of *Leishmania* parasite infection. *Sci Rep* 7(1):10892
- Labrecque N, Cermakian N (2015) Circadian clocks in the immune system. *J Biol Rhythms* 30(4):277–290
- Lamia KA, Storch KF, Weitz CJ (2008) Physiological significance of peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(39):15172–15177
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39(1):151–170
- Matsui MS, Pelle E, Dong K, Pernodet N (2016) Biological rhythms in the skin. *Int J Mol Sci* 17(6):E801
- Morrison H, Young K, Qureshi M, Rowe RK, Lifshitz J (2017) Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Sci Rep* 7(13211):1–12
- Morton GJ, Meek TH, Schwartz MW (2014) Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 15(6):367–378
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308(5726):1314–1318
- Oishi Y, Hayashi S, Isagawa T, Oshima M, Iwama A, Shimba S et al (2017) Bmal1 regulates inflammatory responses in macrophages by modulating enhancer RNA transcription. *Sci Rep* 7(1):7086
- Parkin J, Cohen B (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357(9270):1777–1789
- Petrovsky N (2001) Towards a unified model of neuroendocrine-immune interaction. *Immunol Cell Biol* 79:350–357
- Plog BA, Nedergaard M (2018) The glymphatic system in central nervous system health and disease: past, present, and future. *Annu Rev Pathol* 13:379–394
- Rensing L, Ruoff P (2002) Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol Int* 19(5):807–864
- Sahar S, Sassone-Corsi P (2012) Regulation of metabolism: the circadian clock dictates the time. *Trends Endocrinol Metab* 23(1):1–8
- Savchenko VL, Nikonenko IR, Skibo GG, McKanna JA (1997) Distribution of microglia and astrocytes in different regions of the normal adult rat brain. *Neurophysiology* 29(6):343–351
- Scheiermann C, Kunisaki Y, Lucas D, Chow A, Jang JE, Zhang D et al (2012) Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity* 37(2):290–301
- Scheiermann C, Kunisaki Y, Frenette PS (2013) Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol* 13(3):190–198
- Scheiermann C, Gibbs J, Ince L, Loudon A (2018) Clocking into immunity. *Nat Rev Immunol* 18(7):423–437
- Schibler U, Sassone-Corsi P (2002) A web of circadian pacemakers. *Cell* 111(7):912–922
- Silver AC, Arjona A, Walker WE, Fikrig E (2012) The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity* 36(2):251–261
- Snyder RJ, Lantis J, Kirsner RS, Shah V, Molyneux M, Carter MJ (2016) Macrophages: a review of their role in wound healing and their therapeutic use. *Wound Repair Regen* 24(4):613–629
- Solocinski K, Gumz ML (2015) The circadian clock in the regulation of renal rhythms. *J Biol Rhythms* 30(6):470–486
- Takahashi JS (2017) Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet* 18(3):164–179
- Takayama F, Hayashi Y, Wu Z, Liu Y, Nakanishi H (2016) Diurnal dynamic behavior of microglia in response to infected bacteria through the UDP-P2Y6 receptor system. *Sci Rep* 6:30006
- Terzibasi-Tozzini E, Martínez-Nicolas A, Lucas Sánchez A (2017) The clock is ticking. Ageing of the circadian system: from physiology to cell cycle. *Semin Cell Dev Biol* 70:164–176
- Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K (2012) P2Y receptors in microglia and neuroinflammation. *WIREs Membr Transp Signal* 1:493–501
- Tremblay MÈ, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 31(45):16064–16069
- Videnovic A, Lazar AS, Barker RA, Overeem S (2014) 'The clocks that time us'—circadian rhythms in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 10(12):683–693
- Vincenti JE, Murphy L, Grabert K, McColl BW, Cancellotti E, Freeman TC, Manson JC (2015) Defining the microglia response during the time course of chronic neurodegeneration. *J Virol* 90(6):3003–3017
- Weil ZM, Karelina K, Su AJ, Barker JM, Norman GJ, Zhang N et al (2009) Time-of-day determines neuronal damage and mortality after cardiac arrest. *Neurobiol Dis* 36(2):352–360
- Wolf SA, Boddeke HWGM, Kettenmann H (2017) Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol* 79:619–643
- Wu Y, Dissing-Olesen L, MacVicar BA, Stevens B (2015) Microglia: dynamic mediators of synapse development and plasticity. *Trends Immunol* 36(10):605–613

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Cartel presentado en la XXIII Reunión Nacional de Morfología “Dr. C. Dora Virginia Chávez Corral”. Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua del 23 al 27 de septiembre de 2019.



EFFECTO DE LA VARIACIÓN DIURNA EN EL DAÑO SECUNDARIO POSTERIOR A UN TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO EN HIPOCAMPO Y CORTEZA MOTORA DE RATA

Facultad de Medicina



Martínez-Tapia RJ^{1,3}, Estrada Rojo F¹, López Aceves TG¹, Márquez Salinas A⁴, Rodríguez Mata V², Pulido Camarillo E², Pérez Torres A², Navarro L¹.

1.- Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM; 2.- Depto. de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM; 3.- Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), UNAM; 4.- Plan de Estudios Combinados en Medicina (PECEM).

INTRODUCCIÓN

El traumatismo craneoencefálico (TCE) genera dos tipos de daño: el primario o irreversible debido al efecto mecánico del trauma, y el secundario o reversible caracterizado por cambios celulares en respuesta a excitotoxicidad, estrés oxidativo, neuroinflamación, etc., que de no detenerse pueden llevar a la muerte celular y aumentar la zona de lesión. En nuestro laboratorio hemos observado diferencias en la respuesta neuroconductual en ratas con TCE provocado durante la fase de luz respecto a la de oscuridad. Sin embargo, aún no se ha evaluado si estas diferencias correlacionan con daño tisular regional.

OBJETIVOS

Evaluar si existen diferencias histopatológicas después de la inducción de un modelo de TCE en rata en dos diferentes puntos del ciclo luz-oscuridad.

MATERIAL Y MÉTODOS



Realización de:
Técnica histológica ordinaria para el análisis de cortes sagitales de cerebro



RESULTADOS

Figura 1. Corteza motora.

Fotomicrografías que muestran la evolución de la zona anterior al TCE realizado las 13h o 01h. Nótese el aumento de la basofilia neuronal 24h después del TCE en la lámina 3 (piramidal externa) de la corteza motora y una disminución (no cuantificada) en la cantidad de neuronas en comparación a los grupos controles. A las 72 h, los cambios neuronales se mantuvieron en el grupo con TCE provocado a las 13h; los espacios perineuronales y la vasodilatación fueron más notables que en el grupo traumatizado a la 01h, en el que se observaron neuronas con una morfología normal.

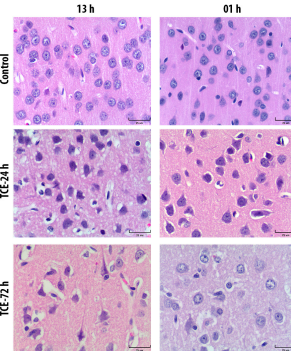


Figura 2. CA1 de hipocampo.

A las 24h después del TCE provocado a las 13h o 01h, ambos grupos mostraron una dispersión de la capa de células piramidales, aparentando un mayor número de neuronas (no cuantificada) comparado con el grupo control. En el grupo de TCE provocado a las 13h hubo mayor dilatación vascular en comparación con los animales con TCE provocado a la 01h, cuyas neuronas piramidales mostraron incremento en la basofilia citoplasmática. A las 72h, el grupo de TCE provocado a las 13h, mostró más neuronas piramidales muertas (eosinofilia citoplasmática) en comparación con el grupo de las de TCE provocado a la 01h, en el cual se observó una mejor preservación tisular pero con la dispersión neuronal observada a las 24h.

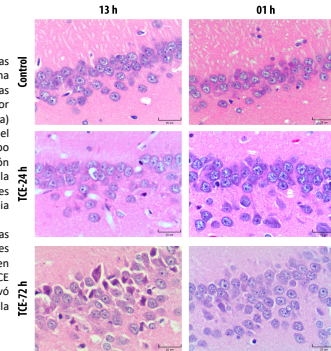


Figura 3. CA3 de hipocampo.

Las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo mostraron cambios similares 24h después del TCE en ambos grupos: aumento de la basofilia citoplasmática neuronal, disminución de la densidad del neuropilo, mayor vasodilatación y aumento del tamaño del soma con neuritas visibles y alargadas. Estos cambios se mantienen después de 72h del TCE provocado a las 13h, mientras que en el grupo con TCE provocado a la 01h, se encontró una mejor preservación de la morfología neuronal. Finalmente, en ambos se observa una disminución del número de neuronas (no cuantificada).

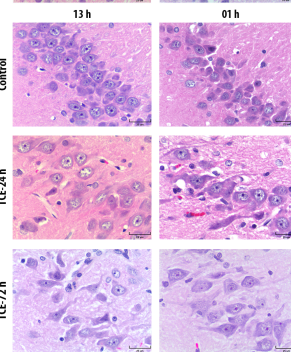
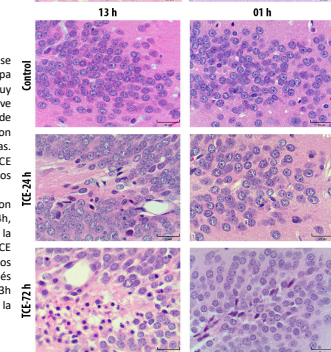


Figura 4. Hilio del GD de hipocampo.

A las 24h de TCE provocado a las 13h, se observaron escasas neuronas de la capa granular muertas, adyacentes a vasos muy dilatados y a sitios de reactividad glial leve (astrogliosis). Sin embargo, la mayoría de los somas neuronales no mostraron cambios y sólo algunas fueron basofílicas. Por el contrario, el grupo de TCE provocado a la 01h no mostró cambios histológicos en la capa granular. A las 72 h después del TCE, se acentuaron los hallazgos descritos a las 24h, particularmente la astrogliosis y la vasodilatación. En el grupo de TCE provocado a la 01h se observaron cambios neuronales similares a los de 24h después del grupo de TCE provocado a las 13h (basofilia neuronal), con excepción de la vasodilatación y la astrogliosis.



CONCLUSIONES

Existen diferencias histológicas en la corteza motora y en las regiones del hipocampo dependiendo de la hora del día en que ocurre el TCE. En este trabajo encontramos un menor daño del tejido nervioso después de TCE provocado a la 01h en comparación con TCE provocado a las 13h. Estas diferencias también dependen de la zona en la que se evaluó, y del tiempo de evolución del TCE. Al parecer, CA1 y el hilio del hipocampo presentan una respuesta neuroprotectora más eficiente que las otras regiones analizadas.

AGRADECIMIENTOS: PAPIIT IN223417 y CONACYT 594665

CONTACTO: lnavarro@unam.mx

Cartel presentado y ganador del PRIMER LUGAR en el concurso de trabajo libre en categoría de “Trabajos de Revisión” durante la XXIII Reunión Nacional de Morfología “Dr. C. Dora Virginia Chávez Corral”. Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua del 23 al 27 de septiembre de 2019.



DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS DE LA MICROGLÍA A LO LARGO DEL DÍA Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA INMUNE. UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Facultad de Medicina



Stephany García Velasco^{1,3}, Ricardo J. Martínez Tapia^{1,4}, Anahí Chavarría², Karina Tarango De Nova^{1,3}, Reinhard Alain Ortiz Beitz^{1,3}, Edgar Martínez Trejo^{1,3}, Antonio Barajas Martínez^{1,4}, Luz Navarro¹.

1. Laboratorio de Neuroendocrinología, Depto. De Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, 2. Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, 3. Programa de Apoyo y Fomento a la Investigación Estudiantil (AFINES), Facultad de Medicina, UNAM, 4. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Unidad de Posgrado, UNAM.



INTRODUCCIÓN

La microglía es el macrófago residente del sistema nervioso central (SNC), actualmente se conoce que esta célula puede detectar activamente signos de daño (ej. patrones moleculares asociados a daño [DAMPs] o a patógenos [PAMPs]) provenientes del microambiente del tejido nervioso, y posteriormente iniciar una respuesta inmunitaria de tipo innata, generando un cambio en su morfología y produciendo diversos factores solubles como citocinas o quimioquinas. Por otro lado, los ritmos biológicos responden a cambios ambientales, fisiológicos o de comportamiento, alterando niveles hormonales, temperatura corporal, metabolismo o incluso procesos cognitivos. Uno de los ritmos biológicos más importantes y estudiados es el ciclo circadiano, que se sincroniza a los cambios de luz-oscuridad. En nuestro laboratorio hemos encontrado variaciones en el pronóstico posterior a la inducción de traumatismo craneoencefálico (TCE) en un modelo animal y consideramos que la respuesta inmune de la microglía juega un papel fundamental en estas diferencias.

OBJETIVO

Buscar bibliografía enfocada a los cambios morfológicos de la microglía a lo largo del día, su correlación con el ciclo circadiano y variaciones diurnas en su respuesta neuroinmune.

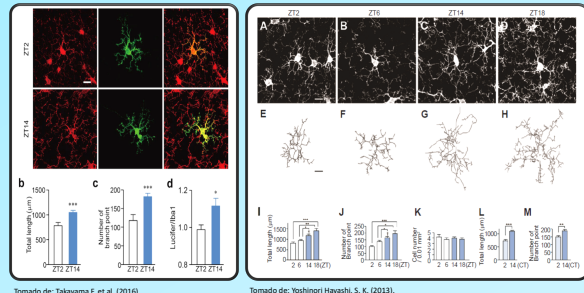
METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda bibliográfica enfocada a la respuesta de las siguientes preguntas: 1- ¿La microglía presenta variaciones en su morfología a lo largo del día?; 2- ¿Existe evidencia de la variación a lo largo del día de factores inmunes en la microglía?; 3- ¿Hay diferencias a lo largo del día en la respuesta de la microglía ante un reto inmune?

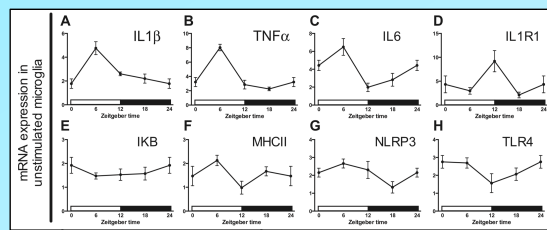
RESULTADOS

1.- ¿La microglía presenta variaciones en su morfología a lo largo del día?

La bibliografía encontrada indica que existen variaciones en la morfología de la microglía dependiendo de la hora del día. Por ejemplo, Hayashi Y, et al, en el 2013 reportaron una variación diurna en la extensión y complejidad estructural de la microglía cortical aislada de ratones, indicando que durante la fase de oscuridad la microglía mostraba una extensión de sus procesos como resultado de un incremento en la expresión de un quimioceptor (P2Y₁₂R), mientras que en la mañana el descenso de la expresión de este receptor daba como resultado una retracción parcial de los procesos de la microglía. Posteriormente, Takayama F, et al en el 2016, mostraron que en ratones, la microglía de corteza cerebral (inmunomarcada con Iba1⁺ y amarillo Lucifer) aumentaba la longitud de sus procesos y el número de ramificaciones en la fase oscuridad (ZT14) en comparación con la fase de luz (ZT2).

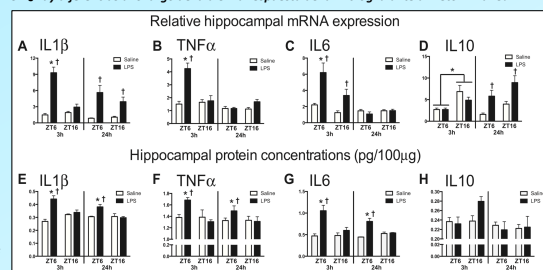


2.- ¿Existe evidencia de la variación de factores inmunes en la microglía a lo largo del día?



Tomado de: Fonken L, et al. (2015). Hasta el momento hemos encontrado que en el trabajo de Fonken et al., 2015, describen la expresión circadiana de RNAm de factores de la inflamación sin estímulo aislada de hipocampo de ratones adultos. En ellos se observó que durante la fase de luz, hubo una mayor elevación de IL-1β, IL-6, TNF-α e IL1R1 en comparación con la fase de oscuridad.

3.- ¿Hay diferencias a lo largo del día en la respuesta de la microglía ante un reto inmune?



Tomado de: Fonken L, et al. (2015). Finalmente, en el mismo estudio de Fonken et al, 2015, encontraron que, dependiendo de la hora del día en que se genere un reto inmune a la microglía, ésta presenta diferencias en la magnitud de la respuesta en el hipocampo. Lo que encontraron, fue una mayor expresión de citocinas pro inflamatorias (IL-1β, TNF-α e IL-6) en ratones inyectados con LPS durante la fase de luz en comparación con aquellos inyectados durante la fase de oscuridad.

CONCLUSIONES

Esta bibliografía es sugerente de que los ritmos circadianos en la inflamación son una propiedad intrínseca de la microglía y muestran que existen cambios morfológicos en esta célula a lo largo del día que pueden relacionarse a su respuesta inmune y posiblemente al pronóstico posterior a una infección o en el caso particular de nuestro laboratorio a una lesión en un modelo de TCE.

REFERENCIAS

Fonken L, et al. (2014). Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock. *Brain Behav Immun*, 45: 171-179.
 Martínez-Tapia R, et al. (2019). Differences in diurnal variation of immune responses in microglia and macrophages: Review and perspectives. *ACCEPTADO en: Cell Mol Neurobiol*.
 Nakazato R, et al. (2016). The intrinsic Microglial Clock System regulates Interleukin-6 expression. *Glia*, 65(1): 199-208.
 Takayama F, et al. (2016). Diurnal dynamic behavior of microglia in response to infected bacteria through the UDP-P216 receptor system. *Sci Rep*, 6:30006.
 Hayashi Y, et al. (2013a). The intrinsic microglial molecular clock controls synaptic strength via the circadian expression of cathepsin S. *Scientific Reports*, 3: 2744.
 Hayashi Y, et al. (2013b). Diurnal spatial rearrangement of microglial processes through the rhythmic expression of P2Y12 receptors. *J Neural Disord*, 1:20.

AGRADECIMIENTOS. PAPIIT: IN223417 y CONACyT: 594665