

“Influencia de los Ritmos Biológicos en la Inmunidad de la Mucosa Intestinal”

Bióloga Bibiana E. Barrios

Directora de Tesis: Prof. Dra. Silvia G. Correa

Dra. Silvia Correa

Firma Director de

Dra. Cristina Motrán

Tesis Firma Miembro de Comisión

Dra. María Ana Contín

Firma Miembro de

Dr. Alfredo Lorenzo

Comisión Firma Miembro de Comisión

Dra. Ana Cecilia Anzulovich

Firma Evaluador Externo

Abreviaturas

ACP: análisis de componentes principales

ADL: análisis discriminante lineal

ALDH: alcohol dehidrogenasa

AR: ácido retinoico

T: azul de Toluidina

CD: células dendríticas

CDi: células dendríticas intestinales

CFSE: carboxifluoresceína succinimidil ester

CG: células goblet

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CP: componentes principales

CPA: células presentadoras de antígenos

Cry: criptocromo

GALT: tejido linfoide asociado al intestino

GLM: ganglios linfáticos mesentéricos

GFP: proteína fluorescente verde

ILF: folículos linfoides aislados

LP: lámina propia

MANOVA: análisis multivariado de la varianza

Muc-2: mucina tipo II

OLS: órganos linfoides secundarios

ON: óxido nítrico

OVA: ovoalbúmina

PAS/AB: ácido periódico de Schiff/alcian blue

Per: período

PP: placas de Peyer

RALDH: retinaldehído dehidrogenasa

SCFA: ácidos grasos de cadena corta

SFB: suero fetal bovino

SILT: tejido linfoide aislado

TCR: receptor de células T

TGF β : factor de crecimiento transformante

TGI: tracto gastrointestinal

TLR: receptor tipo Toll

ViA: vitamina A

WT: wild type

ZT: zeitgeber

Resumen

En mamíferos los ritmos circadianos están regulados por relojes moleculares alojados en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Señales del medioambiente como la luz y la dieta, entrenan el reloj en ciclos de 24 hs que regulan ritmos en sistemas periféricos y cuya alteración se asocia a patologías. En el presente trabajo de tesis hemos caracterizado la influencia de los ritmos biológicos en el funcionamiento de la inmunidad en la mucosa intestinal a lo largo del día. Más específicamente, hemos descripto algunos mecanismos que gobiernan la localización temporal de distintas poblaciones leucocitarias en sitios inductivos de la respuesta inmune como ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y placas de Peyer (PP) y su impacto en fenómenos claves de la homeostasis como la tolerancia hacia antígenos provenientes de la dieta. Encontramos oscilaciones en poblaciones linfocitarias y en distintas subpoblaciones de células presentadoras de antígenos (CPA) a lo largo de un período de 24 hs que estuvieron relacionadas con cambios en los niveles de la quimiocina CCL21 producida en GLM así como con una expresión diferencial de moléculas como CD69 y CD62L. En simultáneo con las oscilaciones en las poblaciones, encontramos diferencias significativas en la producción de citoquinas anti- y pro-inflamatorias entre los períodos diurnos y nocturnos. Estudiamos también la capacidad de CPA obtenidas de vasos linfáticos aferentes a distintos tiempos de inducir células T regulatorias Foxp3⁺ y receptores *homing* sobre linfocitos CD4⁺, y encontramos diferencias significativas entre las fases de actividad/descanso de los animales. A nivel de sitios efectores encontramos cambios en las tónicas que componen las paredes intestinales a lo largo del día en condiciones estándares de luz/oscuridad que se vieron exacerbadas luego de la disrupción lumínica. Estas condiciones también provocaron cambios en las poblaciones linfocitarias en GLM y PP. Tanto los cambios en las poblaciones como la capacidad de las CPAs de inducir Foxp3 o receptores *homing* se encontraron alterados en animales deficientes para el gen *Per2*, lo que muestra que esta capacidad de las CPA depende de la integridad del reloj molecular. El hecho de que el ingreso a GLM de linfocitos y CPA esté sincronizado en un determinado tiempo del día sugiere que habría momentos en los que la probabilidad de que se induzca una respuesta inmune antígeno específica en la mucosa intestinal es mayor. Esta ventana temporal coincidiría con la masiva entrada de antígenos, durante el período de actividad e ingesta de los animales. Nuestros datos también demuestran que tiempos tempranos en el proceso de activación linfocitaria,

sería crucial en la generación y tipo de las respuesta inmunes adaptativas en intestino. Evaluando la respuesta adaptativa específica para ovoalbúmina (OVA) en modelos de tolerancia observamos que la ingesta del antígeno durante la fase oscura tardía induce menores índices de proliferación que cuando la ingesta del antígeno ocurre durante la fase lumínica tardía. Más aún, en ensayos de inducción de poblaciones efectoras y regulatorias, la administración diaria de OVA al final de la fase oscura (ZT23) resultó en una inducción significativamente mayor del factor de transcripción Foxp3 en células OVA específicas (CD4⁺ OT-II⁺) y la localización selectiva de estas células en la lámina propia. Nuestros resultados muestran que en un período de 24 hs, en el GLM existe una ventana temporal determinada en la que confluyen sincronizadamente una serie de condiciones que promueven el desarrollo de respuestas tolerogénicas que son esenciales para la homeostasis intestinal.

Abstract

In mammals circadian rhythms are regulated by molecular clocks localized in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. Signs of the environment such as light and diet, entrains the clock in cycles of 24 hours that regulate rhythms in peripheral systems and whose alteration is associated with pathologies. In the present work we have characterized the influence of biological rhythms on the functioning of immunity in the intestinal mucosa throughout the day. More specifically, we have described some mechanisms that govern the temporal localization of different leukocyte populations in inductive immune response sites such as mesenteric lymph nodes (GLM) and Peyer's plaques (PP) and their impact on key phenomena of homeostasis such as tolerance towards food antigen. We found oscillations in lymphocyte populations and in different subpopulations of antigen presenting cells (APCs) over a 24-hour period that were related to changes in the CCL21 chemokine produced in GLM as well as to a differential expression of molecules such as CD69 and CD62L. According with oscillations in populations, we found significant differences in the production of anti-and pro-inflammatory cytokines between day and night periods. We also studied the ability of CPA obtained from afferent lymphatic vessels at different times to induce Foxp3⁺ regulatory T cells and homing receptors on CD4⁺ lymphocytes, and found significant differences between the activity/rest phases of the animals. At the level of effector sites we found changes in the layers that compose the intestinal walls throughout the day under standard light/dark conditions that were exacerbated after light disruption. These conditions also caused changes in lymphocyte populations in GLM and PP. Both changes in populations as well as the ability of CPAs to induce Foxp3 or *homing* receptors were found to be altered in animals deficient for the *Per2* gene, showing that this ability of CPAs depends on the integrity of the molecular clock. The fact that entry to GLM of lymphocytes and CPA is synchronized at a given time point of day suggests that there would be times when the probability of inducing a specific antigen-specific immune response in the intestinal mucosa is greater. This temporal window would coincide with the massive entry of antigens, during the period of activity and feeding of the animals. Our data also demonstrate that early times in the lymphocyte activation process would be crucial in the generation and type of adaptive immune responses in the gut. By evaluating the specific adaptive response for ovalbumin (OVA) in tolerance models, we observed that the intake of the antigen during the late dark

phase induces lower proliferation rates than when the antigen intake occurs during the late light phase. Moreover, in both effector and regulatory population induction assays, daily administration of OVA at the end of the dark phase (ZT23) resulted in a significantly increased induction of Foxp3 transcription factor in specific OVA (CD4⁺ OT-II⁺) cells and selective localization of these cells in the lamina propria. Our results show that in a period of 24 hours, in the GLM there is a specific time in which conditions that promote the development of tolerogenic responses that are essential for intestinal homeostasis are synchronized.

Indice

Capítulo 1.Introducción

- 1.1. Organización anatómica del sistema inmune intestinal
- 1.2. Tráfico leucocitario en intestino
- 1.3. Ritmos Biológicos

Capítulo 2. Resultados I

- 2.1. Componentes moleculares del reloj circadiano son expresados en GLM.
- 2.2. El número de células totales y de subpoblaciones leucocitarias presentes en GLM fluctua a lo largo del tiempo circadiano.
- 2.3. Evaluación de señales que coordinan el tráfico leucocitario a lo largo del día.
- 2.4. El estado de activación de las poblaciones leucocitarias presentes en GLM cambia a lo largo del día.
- 2.5. Células regulatrias CD4⁺ Foxp3⁺ oscilan de manera circadiana en GLM.
- 2.6. La frecuencia de linfocitos que espresan receptores de *homing* oscila en GLM.
- 2.7. La producción de citoquinas varía a lo largo de 24 hs en la mucosa intestinal.
- 2.8. Análisis multivariado.

Capítulo 3.Resultados II

- 3.1. Celularidad y subpoblaciones linfocitarias en sitios inductivos de ratones Per2KO a lo largo de 24 hs.
- 3.2. Producción de citoquinas en la mucosa intestinal en animales Per2KO a lo largo de 24 hs.
- 3.3. Análisis multivariado.
- 3.4. Cambios en las condiciones ambientales de luz-oscuridad provocan variaciones en las poblaciones linfocitarias en PP y GLM.
- 3.5. Producción demdediadores de relevancia en la inmunidad intestinal.
- 3.6. Morfología del intestino delgado y grueso a lo largo del día.

Capítulo 4. Resultados III

- 4.1. Señales en vasos linfáticos aferentes a los GLM a lo largo del día.
- 4.2. Citoquinas en linfáticos aferentes a lo largo de 24 hs.

- 4.3. Variaciones en las CPA presentes en GLM y linfáticos aferentes a lo largo del día.
- 4.4. Caracterización de CDi tolerogénicas en linfáticos aferentes a lo largo de 24 hs.
- 4.5. Mayor inducción de células CD4⁺ Foxp3⁺ en la fase lumínica.
- 4.6. Inducción de receptores *homing* sobre linfocitos CD4⁺.
- 4.7. Los ritmos biológicos influyen en la tolerancia oral hacia antígenos proteicos.

Capítulo 5. Discusión

Capítulo 6. Materiales y Métodos

Bibliografía

Introducción

1.1. Organización anatómica del sistema inmune intestinal

El intestino es una estructura tubular que forma parte del tracto gastrointestinal (TGI) y se extiende desde el estómago hasta el ano. Entre sus funciones primarias se cuentan la digestión de alimentos, la absorción de nutrientes y agua, y la eliminación de los residuos. El intestino también representa un importante sitio de entrada para muchas bacterias y virus y es el hogar de una vasta y diversa comunidad microbiana cada vez más reconocida por tener un impacto en la fisiología y patología del huésped. Este ambiente dinámico en constante cambio representa una compleja interfase para la vigilancia inmunológica y explica que el intestino contenga la mayor diversidad y número de células inmunes del organismo.

En mamíferos, el intestino consta de dos segmentos (delgado y grueso) que son anatómicamente y funcionalmente especializados y expuestos a diferentes estímulos ambientales (Mowat & Agace, 2014). Para mantener la homeostasis local, cada uno de los segmentos posee estrategias únicas de defensa, incluyendo alteraciones en la composición y función del subconjunto epitelial, integridad de la capa de mucus y un especializado sistema inmunológico. Un continuo intercambio de señales entre el ambiente y el sistema inmune es esencial para el mantenimiento de la homeostasis intestinal.

El intestino delgado consta de duodeno, yeyuno e íleon en orden descendente, y su función principal es la digestión y absorción de nutrientes. Su superficie está caracterizada por proyecciones llamadas vellosidades, que se vuelven progresivamente más cortas y anchas hacia el íleon. Las vellosidades están rodeadas de invaginaciones llamadas criptas de Lieberkühn que contienen las células madre pluripotentes que dan lugar a los diversos linajes epiteliales que cubren la superficie intestinal. En la base de estas criptas, se encuentran las células de Paneth, un tipo especializado de célula epitelial que produce un amplio rango de péptidos antimicrobianos que protegen la esterilidad de la cripta, así como factores de crecimiento que regulan la diferenciación y función de las células madre. Las células epiteliales absorbentes, denominadas enterocitos, recubren las vellosidades y su superficie apical presenta microvellosidades que forman el "borde de cepillo" que optimiza la digestión y absorción de los nutrientes.

Por otro lado, el intestino grueso está cubierto por una única capa de células epiteliales, aunque anatómicamente se dispone enteramente en forma de criptas intercaladas por regiones

planas de epitelio. Del total de células epiteliales el 25% corresponde a células caliciformes productoras de mucus o células goblet (CG) (Birchenough, 2016 #261), mientras que en delgado representan menos del 10%. Mientras que la capa de mucus es difusa en intestino delgado y permeable a las bacterias, en colon está formada por capa interna estéril y una externa de menor densidad que conforma el hábitat de la microflora (Faderl, Noti, Corazza, & Mueller, 2015). Esta capa de mucus está compuesta principalmente por mucina tipo 2 (Muc-2), y no sólo representa la primera línea de defensa de la inmunidad innata del huésped sino que además es un regulador esencial de los fenómenos inflamatorios intestinales, aportando señales que participan en el desarrollo de tolerancia a antígenos alimentarios y de la flora comensal (Shan et al., 2013).

Histológicamente el intestino se compone de cuatro capas: la mucosa, la submucosa, la muscularis y la serosa. La primera, que es proximal al lumen intestinal, consta de una capa de células epiteliales y una lámina propia subyacente (LP) que contiene la inmensa mayoría de las células inmunes. Estas células se encuentran organizadas en estructuras linfoides denominadas en su conjunto tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés) las que se encuentran embebidas en la LP o submucosa o bien distribuidas difusamente a lo largo de la LP. El GALT incluye las placas de Peyer (PPs) de intestino delgado y las placas colónicas, las placas cecales y estructuras más pequeñas colectivamente denominadas tejido linfoide aislado solitario (SILTs), integrado por las criptoplaquetas y los folículos linfoides aislados (ILF) más maduros (Hamada et al., 2002; Pabst et al., 2005). El GALT, junto con el ganglio linfático mesentérico (GLM), constituyen los principales sitios de inducción de la respuesta adaptativa en intestino, mientras que la lámina propia que subyace al epitelio constituye el sitio efector.

1.2. Tráfico Leucocitario en intestino

Siendo la mucosa intestinal uno de los sitios de mayor estimulación antigénica, la regulación homeostática del tráfico celular es crucial para el mantenimiento de la tolerancia. *In vivo* la migración de células inmunes desde y hacia los órganos linfáticos

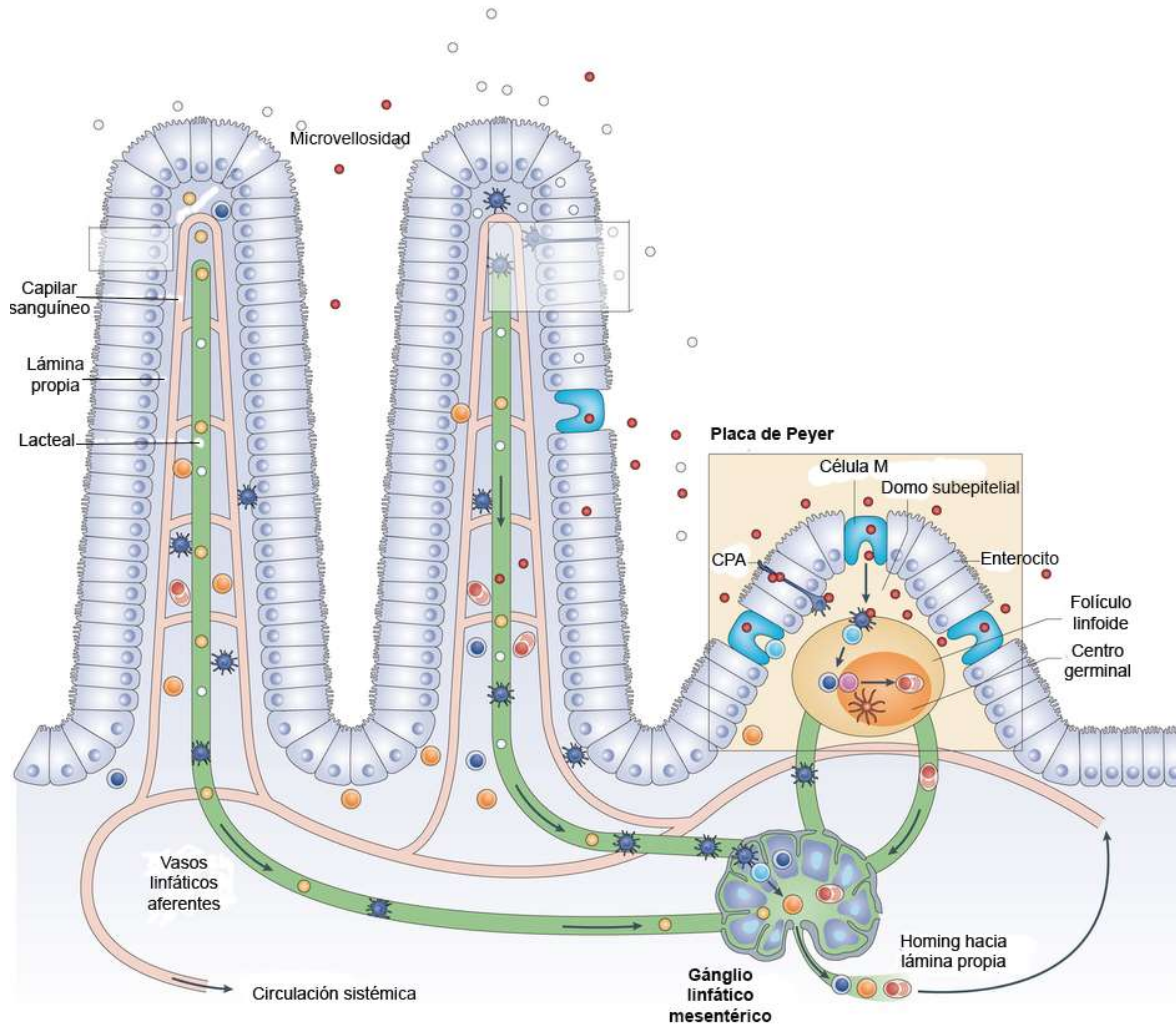


Figura 1. Esquematación de sitios inductores y efectores de la respuesta inmune en mucosa intestinal. Adaptado de Trevaskis y col ., 2015.

secundarios es un proceso cuidadosamente orquestado (Graham & Locati, 2013; Lee, Nibbs, & Graham, 2013). Las quimioquinas son reguladores esenciales de la migración celular durante los procesos homeostáticos e inflamatorios y actúan a través de receptores específicos presentes en la superficie celular. Son producidas constitutivamente por células del estroma de los órganos linfáticos secundarios (Shan et al.) permitiendo un flujo continuo de células desde los tejidos periféricos hacia los OLS como parte de la vigilancia inmunológica. Las quimioquinas pro-inflamatorias, por el contrario son inducidas luego de una injuria y producen el reclutamiento de poblaciones leucocitarias inflamatorias.

El GALT carece de vasos linfáticos aferentes por lo que el muestreo de antígenos lumenales es llevado a cabo por un tipo especial de célula denominada célula M localizada intraepitelialmente por encima del folículo subyacente (PP). Los antígenos captados por las células M son tomados y procesados por las células presentadoras de antígenos (CPA) para su posterior presentación. En el caso de los GLM, los antígenos lumenales son transportados y presentados por CPA especializadas derivadas de la LP (Macpherson & Uhr, 2004). Una de las quimioquinas homeostáticas de mayor importancia en el microambiente intestinal es CCL21, clave para el ingreso y localización de células inmunes en los tejidos linfoides. Se expresa de manera constitutiva en células epiteliales de los endotelios linfáticos y células del estroma de los GLMs y actúa como ligando del receptor CCR7, expresado por linfocitos T y B y por células dendríticas intestinales (CDi) migratorias. Desde los OLS se genera un gradiente de CCL21 que promueve el encuentro entre las células *naïve*, los antígenos y las CPA, resultando en el desarrollo de respuestas inmunológicas específicas (Figura 1). En condiciones inflamatorias en cambio, la inducción de quimioquinas inflamatorias como CCL2 es la que direcciona el tráfico celular hacia los sitios inductivos.

En el intestino, el sistema linfático es clave en la inducción y mantenimiento de la tolerancia, ya que promueve un drenaje continuo de antígenos derivados de la luz intestinal hacia los GLMs. Este transporte se produce tanto en condiciones homeostáticas como durante alteraciones, por lo que el sistema linfático puede también contribuir directamente al desarrollo de inflamaciones en intestino. Comprende dos vías independientes entre sí: la primera formada por los conductos denominados “lactíferos” o “lacteales”, que colectan linfa derivada de las microvellosidades y conductos presentes en la submucosa; la segunda comprende conductos presentes en la capa muscular de la pared del intestino. Ambos sistemas vierten sus contenidos en una red de colectores finales que drenan la linfa directamente a los GLM. En general, los linfáticos que componen tanto los lactíferos como los conductos localizados en la submucosa carecen de células musculares lisas. Debido a esto, su llenado o vaciamiento depende exclusivamente de fuerzas extrínsecas como el peristaltismo, su conexión con el tejido adyacente y las uniones célula-célula. Por el contrario los vasos colectores poseen células lisas y válvulas, lo que permite la conducción de la linfa mediante mecanismos coordinados de contracción y relajación (Figura 2).

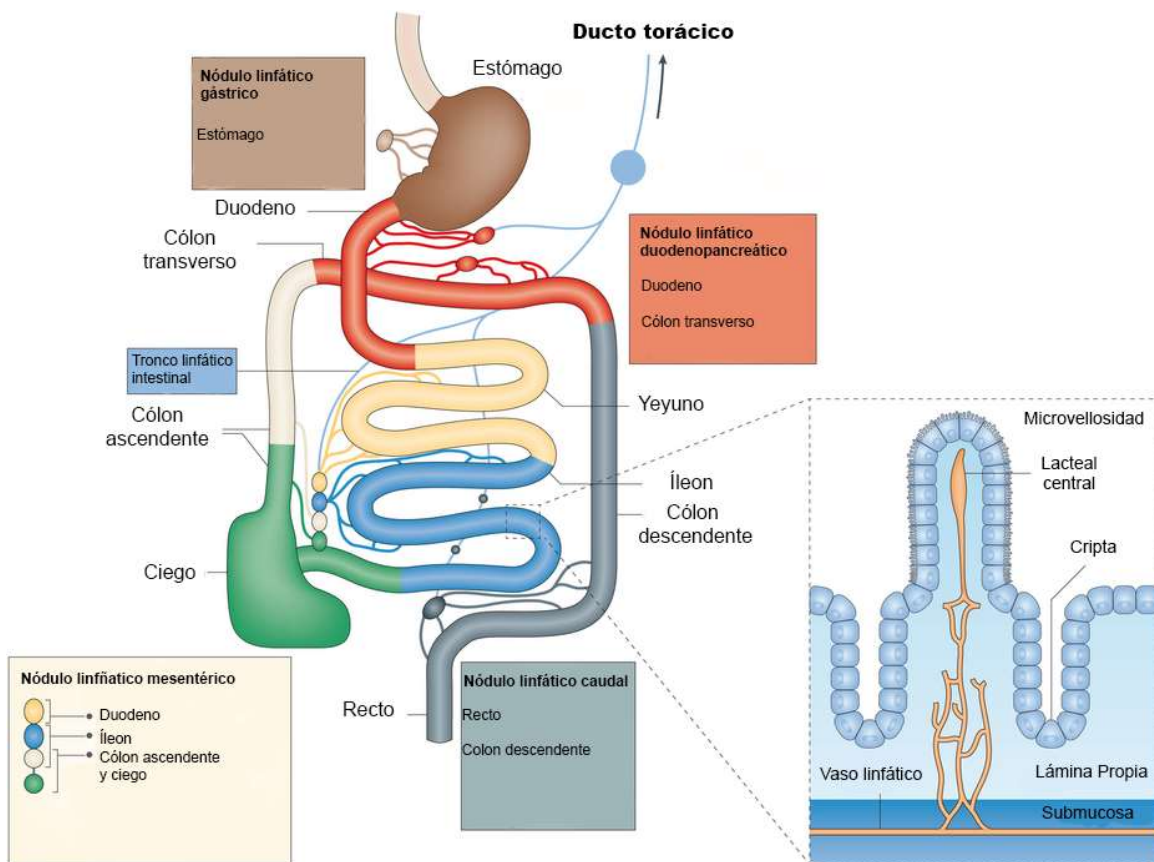


Figura 2. Microanatomía del sistema linfático asociado al intestino. Adaptado de Mowat y Agace, 2014.

En cuanto a las CPA presentes en mucosa intestinal, la expresión de CD103 junto con la integrina CD11b (αM) define dos subpoblaciones de CDi: $CD103^+CD11b^+$ y $CD103^+CD11b^-$ que difieren tanto en la expresión de receptores de quimioquinas como de receptores de reconocimiento de patógenos como los receptores tipo Toll (TLRs), lo que explica las diferencias en su localización y capacidad de pensar y responder a distintos tipos de microorganismos (Figura 3). Las CDi $CD103^+$ residen en estrecho contacto con el epitelio del intestino (Hussain & Pan, 2015) y pueden capturar los antígenos mediante la extensión de dendritas directamente hacia la luz del intestino (Froy & Chapnik, 2007), o mediante la captura de antígenos lumenales que entran en la LP por otros medios, por ejemplo a través de

las células caliciformes o goblet (Froy & Chapnik, 2007; Kohsaka & Bass, 2007). Además de las CD103⁺, en LP reside una población de células fagocíticas CD103⁻ que expresan también el receptor de la quimioquina CX₃CL₁ o “fractalquina” (CX₃CR₁). Mientras que la mayoría de este grupo está compuesta por células derivadas de monocitos CX₃CR₁^{high} CXCR3⁺ residentes de tejido y no inflamatorias, hay además una subpoblación minoritaria de CDi CD103⁻ CX₃CR₁^{int} CCR2⁺ (Farache, Zigmond, Shakhar, & Jung, 2013).

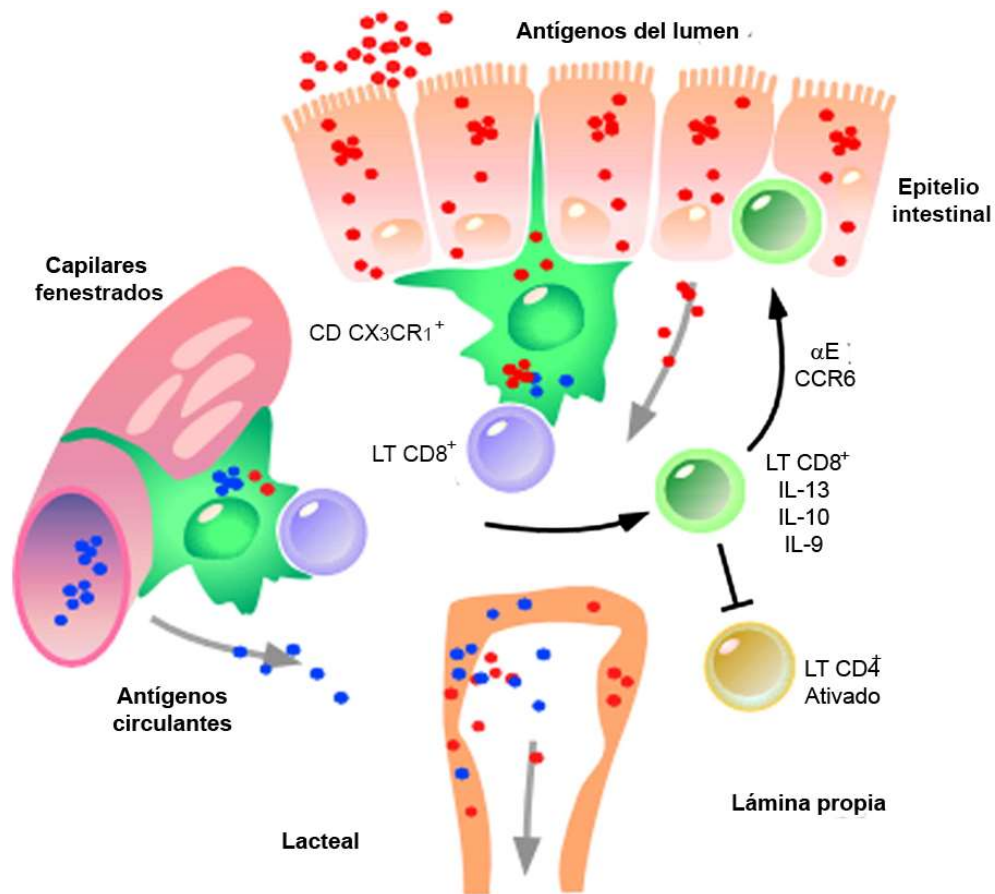


Figura 3. Células dendríticas intestinales. Adaptado de Chang y col., 2013.

Una señal clave en la inmunidad intestinal es la vitamina A (ViA) (Lovett-Racke & Racke, 2002) obtenida a través de la dieta, que es convertida localmente a ácido retinoico (AR) por las células epiteliales del intestino delgado (McDonald et al., 2012), células estromales

locales (Vicente-Suarez et al., 2015) a través de la actividad enzimática de la alcohol dehidrogenasa (ALDH) y la retinaldehído dehidrogenasa (RALDH) (Manicassamy et al., 2009). El AR junto con otras señales como el factor de crecimiento transformante (TGF β) son necesarias para la inducción de células T regulatorias Foxp3⁺ en GLM (Mucida et al., 2009) (Coombes et al., 2007; Elias et al., 2008). Una población de CDi CD103⁺ migratorias presenta gran capacidad de generar AR (Kang, Lim, Andrisani, Broxmeyer, & Kim, 2007). Su rol en el desarrollo de la tolerancia hacia antígenos provenientes de la dieta resulta crucial ya que participan activamente en la inducción de poblaciones regulatorias Foxp3⁺ (Rescigno, 2009) así como en la expresión de receptores de *homing* sobre la superficie de los linfocitos una vez inducida su activación. Mientras que la mayoría de las células regulatorias Foxp3⁺ de intestino delgado parecen desarrollarse en respuesta a antígenos de la dieta, las células regulatorias en colon son inducidas en respuesta a la microbiota (Nishio & Honda, 2012).

La expresión selectiva de moléculas *homing* ocurre en sitios inductivos específicos de la mucosa intestinal como PP o GLM. La expresión de CCR9 y la integrina $\alpha 4\beta 7$ sobre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ luego de su activación promueve su relocalización en la LP, particularmente en intestino delgado proximal (Campbell & Butcher, 2002; Stenstad et al., 2006; Stenstad, Svensson, Cucak, Kotarsky, & Agace, 2007; Svensson et al., 2002). Por el contrario, el receptor GPR₁₅ acoplado a la proteína G promueve el reclutamiento de células T efectoras y reguladoras en LP colónica (Kim et al., 2013; L. P. Nguyen et al., 2015) de CCR9, no está claro dónde y de qué forma este receptor es adquirido por las células T, aunque se especula que podría ocurrir en las placas colónicas (Habtezion, Nguyen, Hadeiba, & Butcher, 2016).

1.3. Ritmos Biológicos

Prácticamente toda la vida en la tierra está expuesta a cambios cíclicos del ambiente generados por la rotación del planeta que se suceden casi cada 24 hs (circadiano). Estos cambios han impulsado el desarrollo de relojes biológicos moleculares que permiten a los organismos anticiparse y adaptarse a cambios temporales de su medio ambiente (Balsalobre, 2002). El ciclo sueño-vigilia es quizás el ritmo circadiano mejor conocido, pero muchos otros sistemas fisiológicos están bajo control circadiano, incluyendo el comportamiento, la actividad locomotora, la temperatura corporal, los sistemas cardiovascular, digestivo y

endócrino y las funciones metabólicas e inmunes (Bedrosian, Fonken, & Nelson, 2016; Blancas-Velazquez, Mendoza, Garcia, & la Fleur, 2017; Cao & Wang, 2017; Green, Takahashi, & Bass, 2008; Hussain & Pan, 2015; Labrecque & Cermakian, 2015; Panda, 2016).

En los mamíferos los procesos biológicos claves son coordinados por relojes endógenos autónomos presentes en todas las células del organismo (Balsalobre, 2002). El mejor caracterizado es el “master clock” localizado en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo (Yan & Okamura, 2002), aunque en la periferia se han descrito otros relojes que sincronizan la expresión de genes vinculados a la actividad tejido-específica dependientes de señales presentes en cada entorno (Balsalobre, 2002). Tanto el sincronizador central como los periféricos están organizados en circuitos de transcripción de genes autorregulables y traducción de proteínas que sufren fluctuaciones circadianas en su propia expresión (Figura 4). Esta maquinaria molecular incluyen los genes de los factores de transcripción *Clock* y *Bmal1* y varios genes como *Periodo* (*Per*) 1, 2 y 3, *criptocromo* (*Cry*) 1 y 2 y receptores nucleares como Rev-erb, RORs y PPAR (Green et al., 2008). Los receptores nucleares Rev-erb α , RORs y PPAR (Green et al., 2008), forman parte de la familia de los receptores huérfanos, y son activados por moléculas endógenas (provenientes del metabolismo) o exógenas (derivadas de alimentos); actúan como factores de transcripción y controlan grupos de genes involucrados en distintas vías regulatorias (Teboul, Grechez-Cassiau, Guillaumond, & Delaunay, 2009).

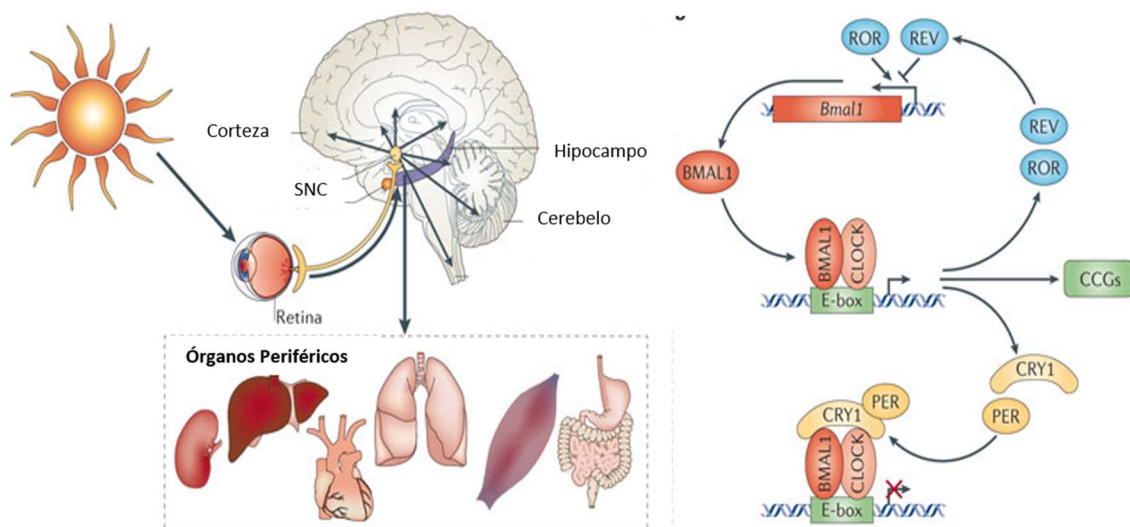


Figura 4. Organización jerárquica del reloj circadiano con un reloj central ubicado en el núcleo supraquiasmático y relojes periféricos localizados en órganos específicos. Cada uno de estos relojes está coordinado molecularmente por una maquinaria de genes denominados en conjunto *Master Clock*. Adaptado de Kondratova y Kondratov, 2012.

Se cree que la coordinación circadiana de los procesos fisiológicos optimiza las funciones metabólicas del organismo. En este contexto mientras que los ciclos de luz:oscuridad sincronizan al reloj central, los ciclos de ayuno:ingesta representarían señales predominantes para los relojes periféricos e implicaría ajustes metabólicos y hormonales coordinados para mantener el aporte nutricional y la homeostasis a lo largo del día (Bron & Furness, 2009; Feillet, Albrecht, & Challet, 2006). Así, se ha demostrado que la ingesta en momentos inapropiados perturba la organización circadiana provocando cambios metabólicos adversos y contribuyendo al desarrollo de patologías crónicas (Challet, 2014; Grosbellet et al., 2016; Hatori & Panda, 2015; Longo & Panda, 2016; Potter, Cade, Grant, & Hardie, 2016; Wu et al., 2015).

Diferentes trabajos realizados con modelos animales y en humanos han evidenciado variaciones cíclicas diarias en las funciones del TGI (Hussain, 2014; Hussain & Pan, 2015; Mendoza, Graff, Dardente, Pevet, & Challet, 2005; Moore et al., 2014; Pacha & Sumova, 2013; Pan & Hussain, 2009; Yoshida, Aoki, Tanaka, Aoyama, & Shibata, 2015) que podrían ser controladas activamente por un reloj biológico local. En el caso del intestino, los alimentos, metabolitos derivados de nutrientes o bien hormonas dependientes de la ingesta serían las señales del lumen candidatas para la sincronización de la actividad intestinal (Kohsaka & Bass, 2007). En el TGI del ratón, se ha demostrado la presencia de los genes del reloj circadiano en el epitelio y base de las criptas, en las células de Paneth, y en el plexo mioentérico (Hoogerwerf et al., 2007) y se ha determinado que un 3,7% de los genes del colon distal se expresa rítmicamente (Hoogerwerf et al., 2008). Aunque aún no se conoce con detalle la contribución de los ritmos a la fisiología intestinal, se postula que alteraciones en este ritmo se asociarían a distintos desórdenes metabólicos (Duez & Staelens, 2008a, 2008b; Hussain & Pan, 2015), procesos gastrointestinales inflamatorios y cáncer (Hoogerwerf et al., 2007; Sahar & Sassone-Corsi, 2009). La importancia de un reloj biológico que sincroniza la

función intestinal se evidencia en ratones mutantes *Clock*^{-/-} en los que se encuentra aumentada la absorción de lípidos y carbohidratos a lo largo del día y disminuída la absorción de péptidos, lo que conlleva al desarrollo de trastornos metabólicos (Marcheva et al., 2010).

En cuanto al sistema inmune asociado a la mucosa gastrointestinal se ha confirmado la expresión rítmica de los genes del reloj en órganos como GLM (Keller et al., 2009), células como epitelio (Mukherji, Kobiita, Ye, & Chambon, 2013) y macrófagos (Hayashi, Shimba, & Tezuka, 2007; Keller et al., 2009) o moléculas asociadas al reconocimiento de patógenos (Froy & Chapnik, 2007) o factores protectores de la mucosa (Johns, Newton, Westley, & May, 2005). Además, factores trefoil o péptidos antimicrobianos como las defensinas, se liberan con rítmicamente, principalmente en horas de la madrugada (Froy & Chapnik, 2007). Se cree que este ritmo intrínseco repercutiría directamente en la funcionalidad del TGI y en la eficacia de la respuesta inmune, posibilitando la continua re-generación de mediadores que participan en la protección de la mucosa (Bron & Furness, 2009). La expresión de este gran conjunto de factores de manera rítmica y no continua, optimizaría la protección de la mucosa intestinal proporcionando mayor plásticidad en caso de estímulos agudos y posibilitando al sistema inmune la anticipación en las respuestas requeridas (Bron & Furness, 2009).

Se ha descrito que distintos parámetros relevantes para la respuesta inmune innata y adaptativa como el tráfico de células, la susceptibilidad a infecciones y al choque séptico mediado por endotoxinas, la expresión de receptores de reconocimiento de patrones y sus vías de señalización, la fagocitosis, la secreción de complemento y factores de coagulación y la producción de citoquinas y quimioquinas oscilan de manera circadiana (K. L. Adams, O. Castanon-Cervantes, J. A. Evans, & A. J. Davidson, 2013; O. Castanon-Cervantes et al., 2010; Hayashi et al., 2007; Keller et al., 2009; Liu et al., 2006; Mukherji et al., 2013; Paladino, Leone, Plano, & Golombek, 2010; Wang et al., 2016).

Se ha demostrado que el reloj molecular del huésped influye en la composición de la microbiota intestinal (C. A. Thaiss et al., 2014) y que la microbiota intestinal afecta al reloj molecular del huésped (Leone et al., 2015). Los ratones libres de gérmenes que carecen de microbiota intestinal exhiben diferencias significativas en la expresión de redes de genes metabólicos en el hígado y de los genes del reloj circadiano en el cerebro, cuando se los compara con ratones convencionales. Sorprendentemente, la microbiota intestinal también

sufre oscilaciones funcionales que afectarían la fisiología del huésped (C. A. Thaiss et al., 2016). Utilizando enfoques multi-ómicos estos autores demostraron que la microbiota intestinal presenta una localización biogeográfica oscilante y patrones metabólicos que determinan la exposición rítmica del epitelio intestinal a diferentes especies bacterianas y sus metabolitos a lo largo de un día. Este comportamiento microbiano induce la programación de las oscilaciones transcripcionales, epigenéticas y de los metabolitos del huésped.

La mayoría de los genes de mamíferos exhiben fluctuaciones diarias en su expresión, haciendo de los ritmos circadianos la mayor red reguladora conocida en la fisiología normal (Longo & Panda, 2016). La expresión circadiana de moléculas genera la sincronización entre células y tejidos y los ritmos intracelulares e intercelulares optimizan la fisiología del huésped, debido a que producen la coordinación temporal de distintos procesos simultáneos. En base a esta conceptualización, en esta tesis nos propusimos evaluar el carácter integrador de los ritmos circadianos en la fisiología intestinal y aportar una nueva perspectiva para la comprensión de la actividad inmune en un escenario de máxima complejidad.

En base a lo anteriormente descrito nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizamos la presencia de ritmos biológicos en sitios inductivos de la inmunidad intestinal.
2. Establecer si deficiencias en componentes del reloj molecular o cambios en los ciclos de luz-oscuridad resultan en alteraciones en la función del sistema inmune intestinal.
3. Establecer el efecto de las oscilaciones circadianas en la inducción de tolerancia oral hacia antígenos provenientes de la dieta.

Resultados I

Capítulo 2-Resultados I

Distintos estudios realizados tanto en modelos animales como en humanos han demostrado oscilaciones circadianas en las funciones del TGI que podrían ser controladas activamente por un reloj biológico local (Hussain, 2014; Hussain & Pan, 2015; Mendoza et al., 2005; Moore et al., 2014; Pacha & Sumova, 2013; Pan & Hussain, 2009; Yoshida et al., 2015). En ratones se han descrito diferentes componentes del reloj circadiano en el epitelio y en el plexo mioentérico (Hoogerwerf et al., 2007) y mediante la utilización de técnicas de *microarray*, se ha determinado que un 3,7% de los genes en el colon distal se expresa rítmicamente (Hoogerwerf et al., 2008).

La importancia de contar con un reloj biológico que sincronice la función intestinal se hace evidente en ratones deficientes para *Clock*, uno de los genes del reloj, ya que en estos animales el intestino absorbe mayores cantidades de lípidos y carbohidratos y menores cantidades de péptidos a lo largo del día, lo que conlleva a la aparición de trastornos metabólicos (Hussain & Pan, 2009; Pan & Hussain, 2009).

En cuanto al sistema inmune asociado al TGI se ha confirmado la expresión rítmica de alguno de los genes del reloj en tejido linfoide (Keller et al., 2009), en células epiteliales (Mukherji et al., 2013), macrófagos (Hayashi et al., 2007; Keller et al., 2009) y linfocitos (Fortier et al., 2011). Además, moléculas asociadas al reconocimiento de patógenos como los TLR y receptores tipo NOD (dominio de oligomerización de nucleótidos) (Froy & Chapnik, 2007) o factores trefoil que actúan como protectores de la mucosa (Johns et al., 2005), tienen una expresión rítmica.

Este ritmo intrínseco repercutiría directamente en la funcionalidad del TGI y en la eficacia de la respuesta inmune, posibilitando la continua re-expresión de factores que participan en la protección de la mucosa (Bron & Furness, 2009). Además, en el caso del intestino, señales del lumen como los alimentos, metabolitos derivados de nutrientes o las hormonas liberadas durante la ingesta serían las candidatas para la sincronización de la actividad intestinal (Kohsaka & Bass, 2007).

En una primera etapa caracterizamos la presencia de ritmos biológicos en sitios inductivos de la inmunidad intestinal evaluando:

1. La expresión de genes del reloj como *Bmal1* y *Per2* en células totales de GLM.
2. La celularidad y las subpoblaciones leucocitarias presentes en sitios específicos de inducción de la respuesta inmune en intestino a lo largo de 24 hs.
3. La presencia de señales que coordinan el tráfico leucocitario durante este período.
4. La producción de citoquinas en distintos sitios y órganos de la mucosa intestinal a lo largo de 24 hs.
5. El microambiente de los sitios inductivos de la mucosa intestinal a distintos tiempos del día mediante el análisis estadístico multivariado.

2.1. Componentes moleculares del reloj circadiano son expresados en GLM

La expresión de los genes del reloj *Per2* y *Bmal1* se determinó por real time PCR en GLM de animales WT de 2-3 meses de edad mantenidos en condiciones estándares de 12:12 luz:oscuridad (LD). En este trabajo se definió al inicio de la fase lumínica (7 a.m.) como ZT=0 (por Zeitgeber time). Las muestras fueron obtenidas a los ZT5, 11, 17 y 23 que corresponden a las horas 12, 16, 24 y 6, respectivamente.

Los niveles totales de expresión de *Bmal1* a lo largo de un día (24 hs) fueron significativamente mayores a los encontrados para *Per2* (Figura 5A, $p < 0,05$). Por otra parte *Per2* mostró una modesta oscilación con valores menores a los ZT11/23 y mayor expresión a ZT5/17 mientras que *Bmal1* mantuvo niveles similares entre los ZT5 a 23 (Figura 5B).

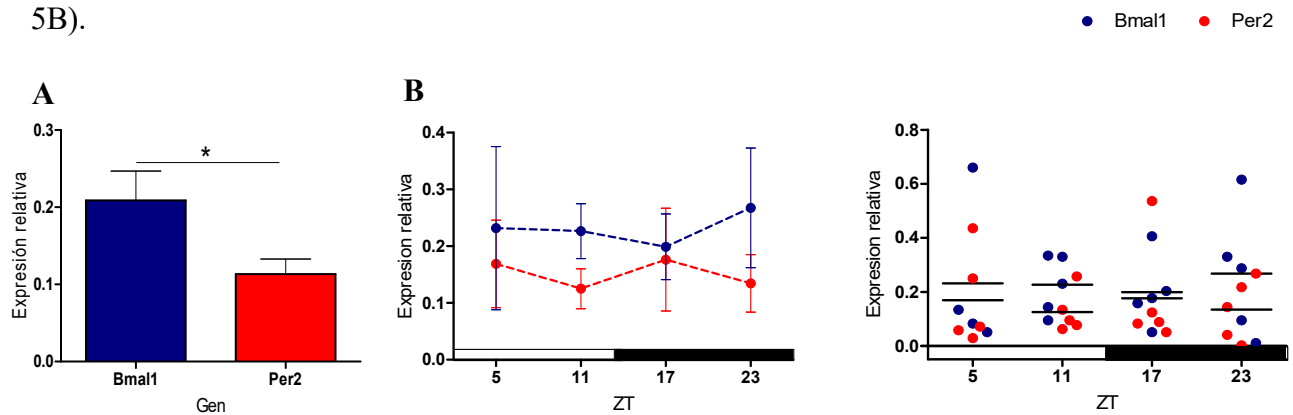


Figura 5. Expresión de genes del reloj en GLM. Se extrajo RNAm de ratones WT en ciclos de 12:12 LD cada 6 hs a lo largo de un día. Por real time PCR se determinó la expresión total de los genes del reloj *Bmal1* y *Per2* en un día (A) o a distintos tiempos a lo largo de 24 hs (B). Los datos se relativizaron con la expresión del gen *Gapdh* y se expresaron como medias o valores individuales. Expresión de *Bmal1*/24 hs vs. *Per2*/24 hs. * $p < 0,05$.

2.2. El número de células totales y de subpoblaciones linfocitarias en GLM fluctúa a lo largo del tiempo

Trabajos previos han descripto oscilaciones diarias en distintas poblaciones de leucocitos en sangre periférica tanto en humanos como en ratones (Dimitrov et al., 2009; Druzd, de Juan, & Scheiermann, 2014; Scheiermann, Kunisaki, & Frenette, 2013) (Arjona & Sarkar, 2006b; Scheiermann et al., 2013) (Labrecque & Cermakian, 2015). Más aún, tanto células de la inmunidad innata (macrófagos y CDs) como de la inmunidad adaptativa (linfocitos B y T) poseen los componentes moleculares del reloj circadiano (Bollinger et al., 2009; Hemmers & Rudensky, 2015; A. C. Silver, Arjona, Walker, & Fikrig, 2012). En base a estos antecedentes nos propusimos determinar la celularidad de PP y GLM cada 6 hs a lo largo del día en ratones WT mantenidos en ciclos de 12:12 LD.

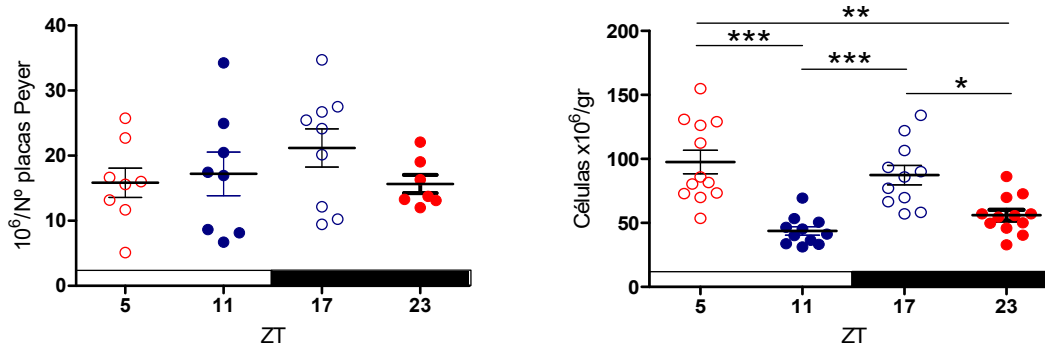


Figura 6. Celularidad en sitios inductivos a lo largo de un ciclo de 24 hs. Se analizó el número absoluto de leucocitos en PP y GLM en ratones WT normales a los ZT5,11,17 y 23. Los datos son medias \pm SEM de $n=7-12/\text{horario}$. Los datos se normalizaron considerando un número de 5 PP/ ratón y el peso del órgano en gramos para los GLM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En ambos tejidos se observaron variaciones en el recuento leucocitario (Figura 6). En PP observamos valores menores al ZT23 con una ligera tendencia a aumentar al ZT17 en tanto que en GLM se observó una clara oscilación con valores mayores a los ZT5 y 17 y mínimos a los ZT11 y 23.

De igual modo, se determinó el porcentaje y número absoluto de subpoblaciones de linfocitos B CD19⁺ y linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en sitios inductivos mediante citometría de flujo. En PP (Figura 7) varió la frecuencia de las células CD19⁺, con un incremento durante el período lumínico (ZT5; $p<0,001$) mientras que los linfocitos CD4⁺ se encontraron aumentados en número absoluto durante la fase nocturna (ZT17, $p<0,05$).

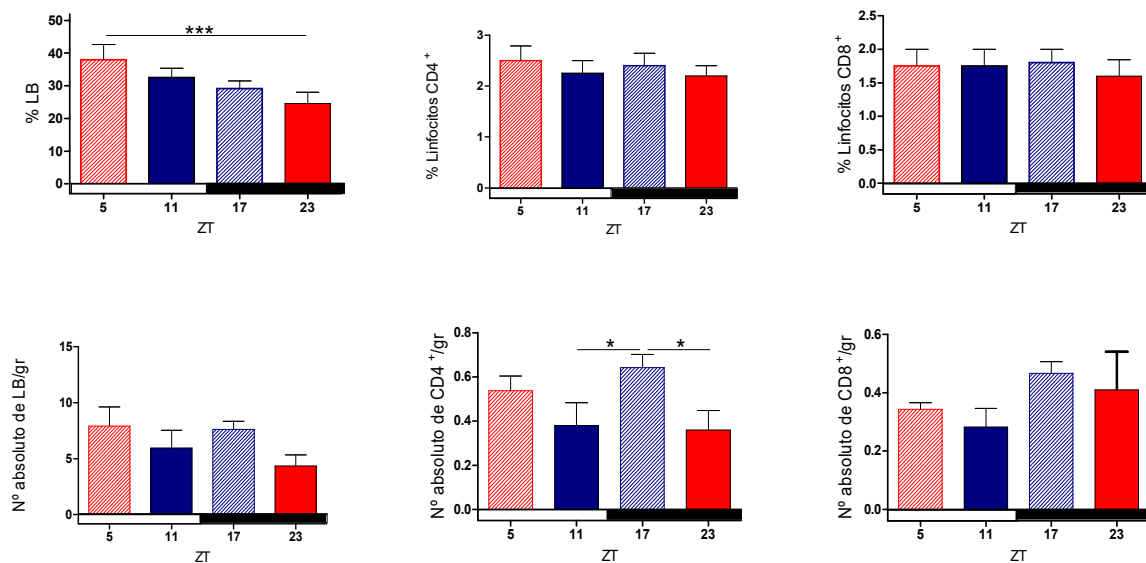


Figura 7. Porcentaje y número absoluto de poblaciones linfocitarias en PP a lo largo de un ciclo de 24 hs. Se analizaron las subpoblaciones de LB CD19⁺, LT CD4⁺ y LT CD8⁺ a los ZT5, 11, 17 y 23 en ratones WT normales mediante citometría de flujo. Los datos (% y Nº absoluto x 10⁶) fueron normalizados considerando un número de 5 PP por ratón y se expresaron como medias ± SEM; n=3-5 /horario. * $p<0,05$; *** $p<0,001$.

En GLM (Figura 8) se observó un aumento significativo tanto en el porcentaje como en el número absoluto de células CD19⁺ al final de la fase lumínica (ZT11) mientras que el número absoluto de las células CD4⁺ y CD8⁺ se encontró significativamente aumentado durante la fase diurna (ZT5)

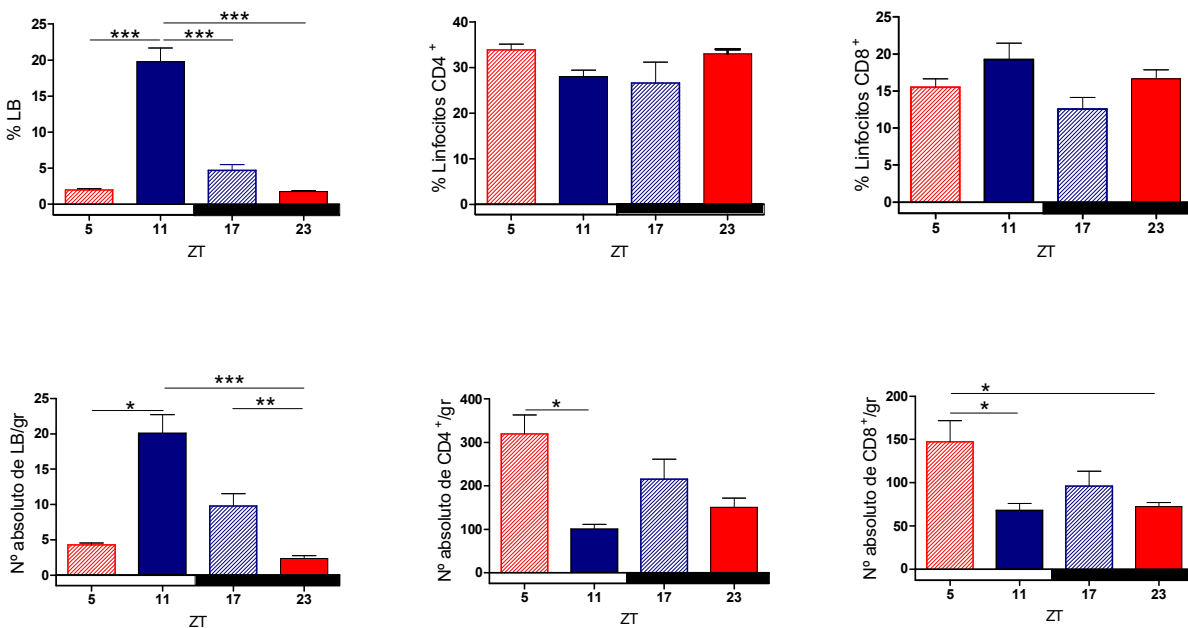


Figura 8. Porcentaje y número absoluto de poblaciones linfocitarias en GLM a lo largo de un ciclo de 24 hs. Se analizaron las subpoblaciones de LB CD19⁺, LT CD4⁺ y LT CD8⁺ a los ZT5, 11, 17 y 23 en ratones WT normales mediante citometría de flujo. Los datos (% y N° absoluto x 10⁶) se normalizaron por gramo de tejido y se representaron como medias ± SEM de n=8/horario. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Estos resultados muestran una oscilación circadiana en la celularidad y las subpoblaciones linfocitarias en los sitios inductivos de la inmunidad intestinal que podría ser relevante en la generación de las respuestas efectoras.

2.3. Evaluación de señales que coordinan el tráfico leucocitario a lo largo del día

Para comprender mejor los mecanismos responsables de las marcadas variaciones en las subpoblaciones linfocitarias observadas en los GLM, estudiamos una de las señales que podrían estar participando en el reclutamiento diferencial de estas células. En tejido total de GLM obtenido a distintos tiempos evaluamos por Western blot los niveles de la quimioquina CCL21, uno de los ligandos del receptor CCR7 expresado tanto por linfocitos como por CDs.

De manera consistente con lo observado en la celularidad, encontramos oscilaciones en los niveles de esta quimioquina con mayores niveles a los ZT11 y 23 (Figura 9).

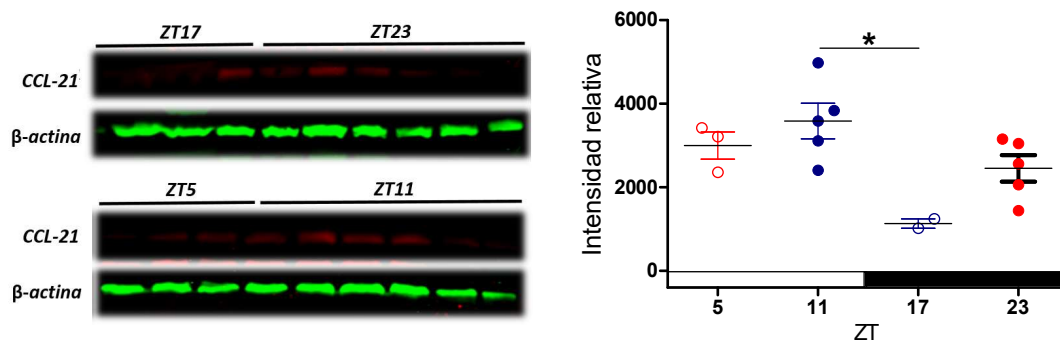


Figura 9. Expresión de la quimioquina CCL-21 en GLM a lo largo de un ciclo de 24 hs. Se analizaron los niveles de CCL21 en homogenato de GLM a los ZT5, 11, 17 y 23 en ratones WT normales mediante Western blot. Los datos se normalizaron con la expresión de β -actina. Medias \pm SEM de $n=3-5$ /horario. * $p<0,05$.

2.4. El estado de activación de las poblaciones linfoides presentes en GLM cambia a lo largo de 24 hs

El marcador CD62L es una molécula de adhesión celular que se expresa sobre la superficie de los linfocitos naïve o de memoria central, permitiendo su unión con el endotelio vascular y posterior ingreso al tejido linfoide. En los GLM, debido a la interacción con CPA profesionales, los linfocitos pueden activarse de manera antígeno específica y como consecuencia disminuir los niveles de CD62L conforme aumenta la expresión de la molécula CD69. Esta última no sólo es un marcador de activación linfocitaria temprana sino que está relacionada con un arresto de la célula en el tejido linfoide secundario donde se ha activado.

Estudiamos entonces si el estado de activación de los linfocitos en GLM variaba a lo largo de 24 hs. Mediante citometría de flujo evaluamos la proporción de linfocitos T $CD4^+$ o $CD8^+$ $CD62L^+$ (naïve o de memoria central) y $CD62L^-$ (efectores o de memoria efectora) en animales WT expuestos a condiciones estándares de luz-oscuridad (Figura 10).

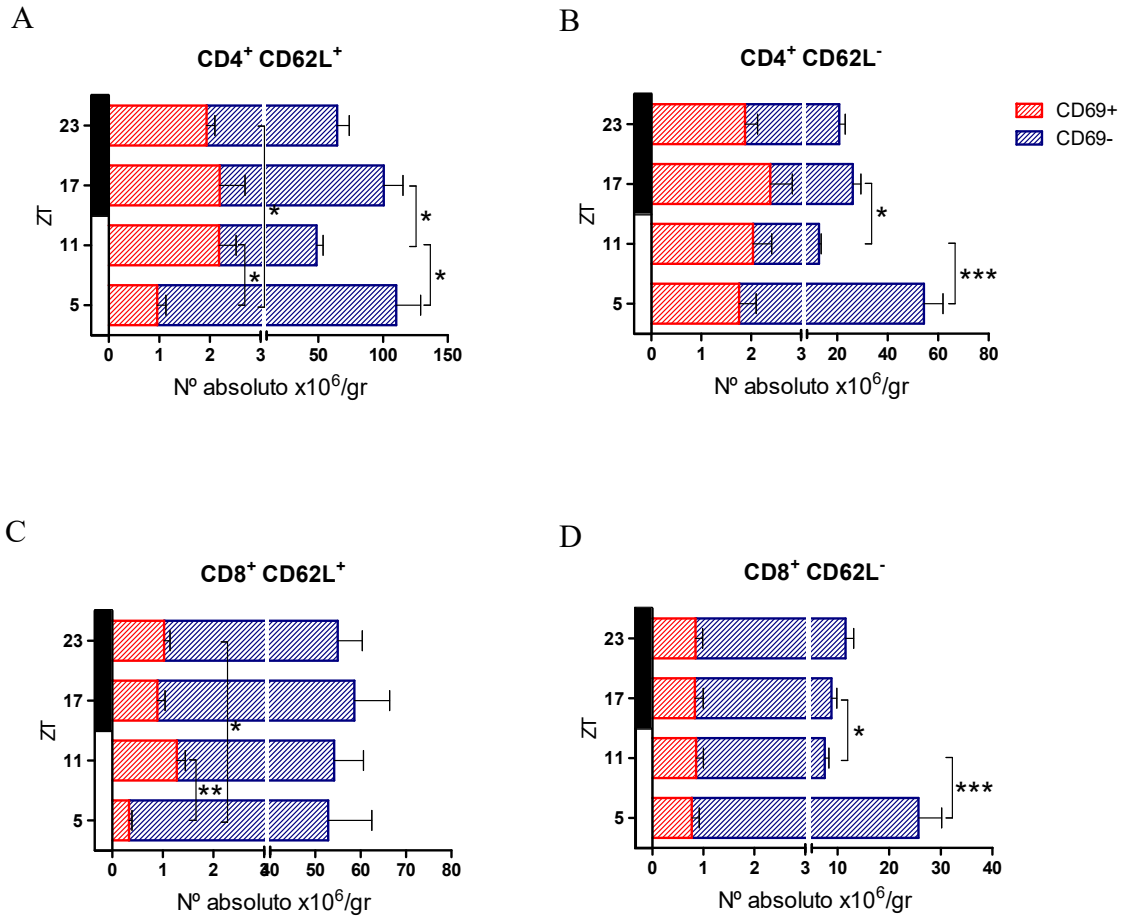


Figura 10. Estado de activación de linfocitos T en GLM a lo largo de un período de 24 hs. Linfocitos CD4⁺ CD62L⁺ (A) o CD62L⁻ (B) y CD8⁺ CD62L⁺ (C) o CD62L⁻ (D) que expresan o no el marcador CD69 en GLM de animales expuestos a condiciones estándares de luz-oscuridad durante un período de 24 hs. Los valores se normalizaron por gramo de tejido y se representaron como N° absoluto x10⁶; media ± SEM de n=8/horario. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tanto los linfocitos CD4⁺CD62L⁺ como los CD4⁺CD62L⁻ mostraron oscilaciones a lo largo de las 24 hs, con mayor número absoluto a los ZT5/17 hs y mínimo al inicio de la fase nocturna (ZT11). Sin embargo en ambos casos la menor activación de células, evaluada a través de la expresión de CD69, se observó al ZT5.

En cuanto a los linfocitos CD8⁺, observamos un menor número de células CD62L⁺CD69⁺ durante la fase diurna (ZT5) mientras que los CD62L⁻CD69⁻ mostraron un significativo incremento al ZT5 y luego disminuyeron previo al inicio de la fase nocturna. Es interesante

descartar también que los linfocitos CD8⁺CD62L⁺CD69⁻ permanecieron constantes a lo largo del día al igual que los CD8⁺CD62L⁻CD69⁺.

2.5. Células regulatorias CD4⁺ Foxp3⁺ oscilan de manera circadiana en GLM

Considerando el papel fundamental de las células regulatorias CD4⁺Foxp3⁺ en la homeostasis intestinal y en la inducción y mantenimiento de la tolerancia hacia antígenos de la dieta y de la microbiota, analizamos también la proporción de esta subpoblación a lo largo de un período de 24 hs (Figura 11).

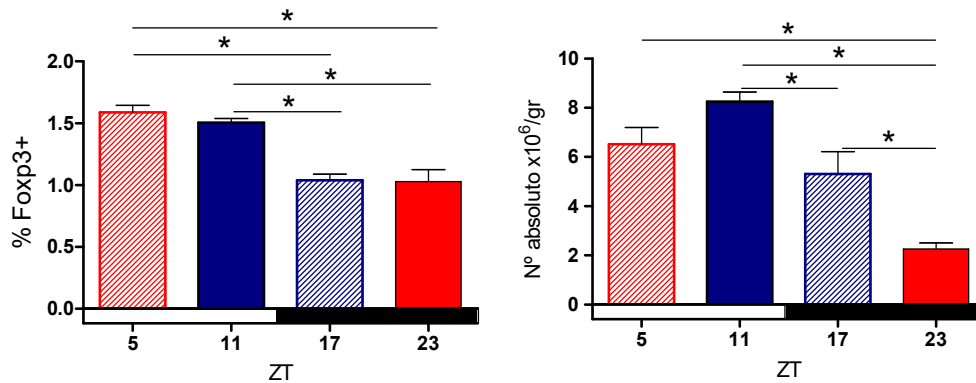


Figura 11. Porcentaje y número absoluto de células regulatorias evaluadas en GLM a lo largo de un período de 24 hs. Se analizaron células CD4⁺ Foxp3⁺ de animales Foxp3-GFP mantenidos en condiciones estándares de luz-oscuridad mediante citometría de flujo. Los datos se expresaron como N° absoluto x 10⁶ y se normalizaron por gramo de tejido; medias ± SEM de n=3/horario. * $p < 0,05$.

De manera similar a lo observado con las poblaciones de linfocitos T y B, encontramos oscilaciones en los recuentos de células regulatorias a lo largo del día con valores mínimos durante la noche (ZT17 y 23) y máximos en el día (ZT5 y 11) tanto en porcentaje como en número absoluto.

2.6. La frecuencia de linfocitos que expresan receptores de homing oscila en los GLM

Analizamos también si existen oscilaciones a lo largo del día en la capacidad de las distintas poblaciones de linfocitos de recircular a los sitios efectores (*homing*). Para ello evaluamos mediante citometría de flujo la expresión de los receptores de homing $\alpha_4\beta_7$ y CCR9 en linfocitos B CD19⁺ y T CD4⁺ y CD8⁺.

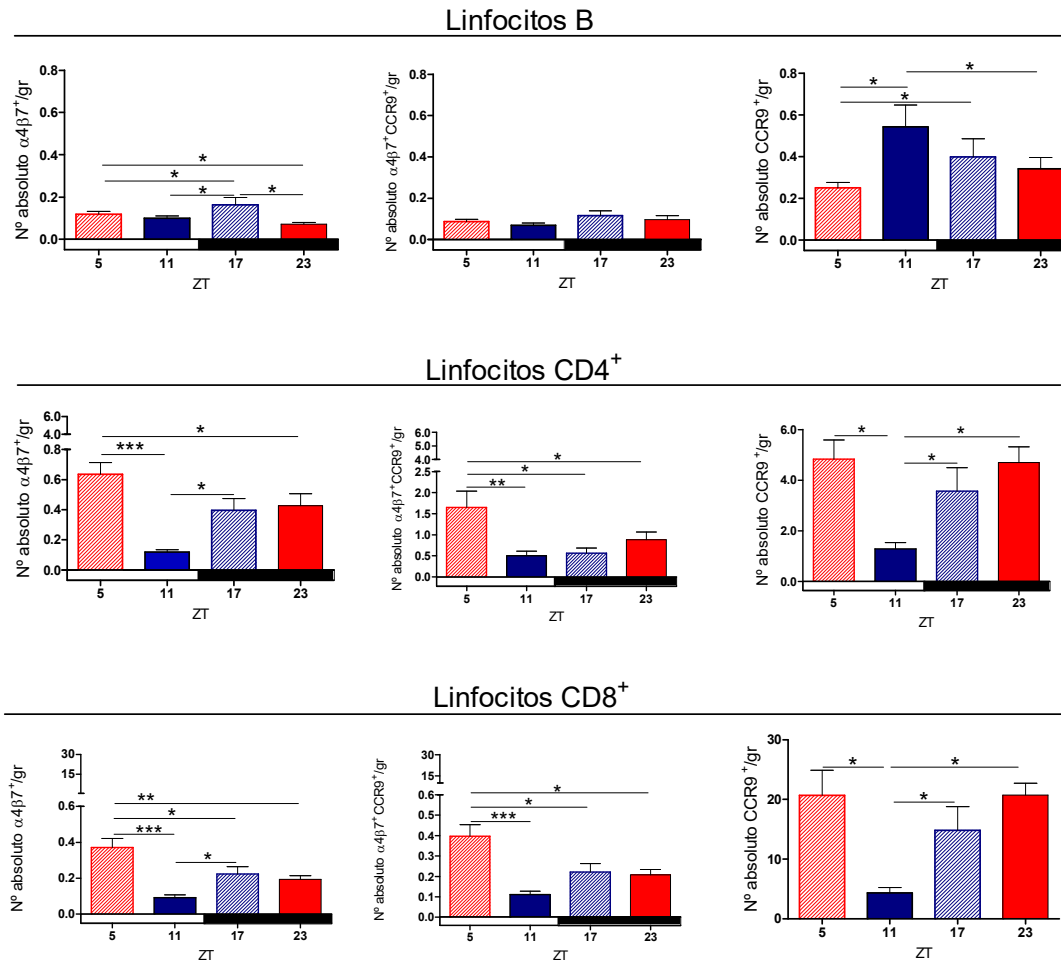
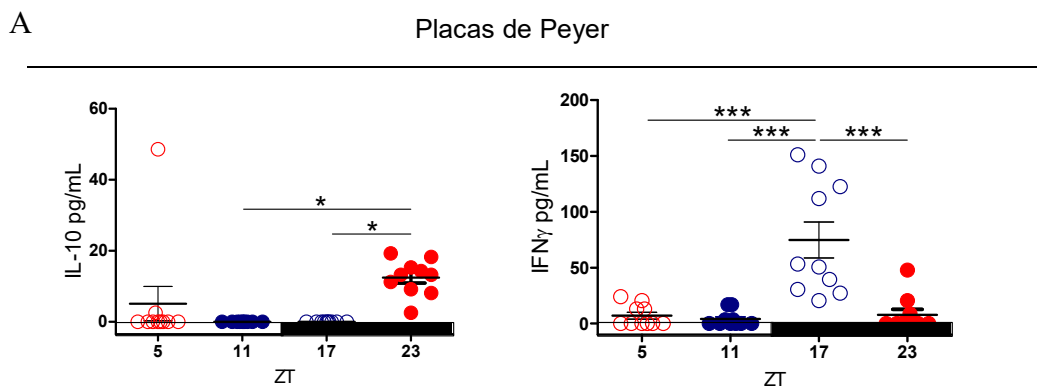


Figura 12. Receptores de *homing* en linfocitos de los GLM a lo largo de un período de 24 hs. En ratones WT expuestos a condiciones estándares de luz-oscuridad se analizó mediante citometría de flujo la expresión de CCR9 y $\alpha_4\beta_7$. Los datos se normalizaron por gramo de tejido y se representaron como N° absoluto x 10⁶; medias \pm SEM de n=8/horario. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En linfocitos B encontramos oscilaciones circadianas en la expresión de estos receptores con un aumento significativo en células $\alpha_4\beta_7^+$ al ZT17 y de células $CCR9^+$ al ZT11. Los linfocitos T mostraron un patrón diferente con máximos al ZT5 y mínimos al ZT11 en células $\alpha_4\beta_7^+$, $CCR9^+$ y en las que expresaron ambos receptores ($\alpha_4\beta_7^+CCR9^+$) (Figura 12).

2.7. La producción de citoquinas varía a lo largo de 24 hs en la mucosa intestinal

La existencia de un reloj biológico en sitios inductivos sugiere una regulación temporal de las funciones en este tejido. Nos preguntamos entonces si la producción de citoquinas estaría sujeta a esta regulación. Para ello se evaluó mediante ELISA la producción de citoquinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10), pro-inflamatorias ($IFN\gamma$, IL-17 e IL-23) o relevantes en la inmunidad de mucosas (IL-22) en sobrenadantes de cultivos de células de sitios inductivos obtenidas a los distintos tiempos y estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 durante 48 hs.



B

Ganglio linfático mesentérico

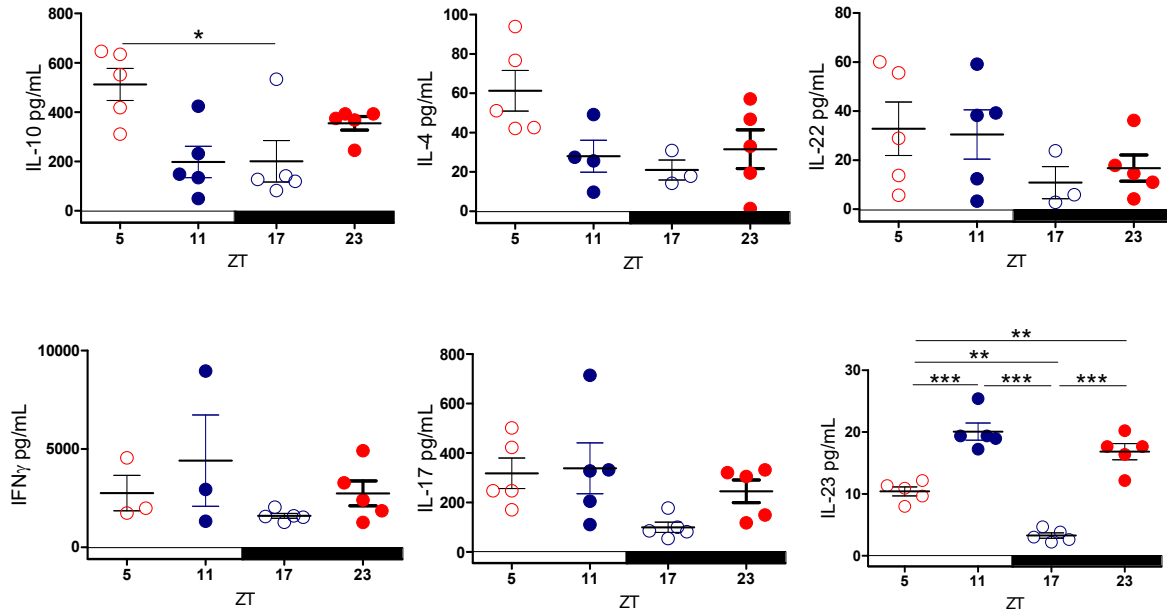


Figura 13. Producción de citoquinas en sitios inductivos a lo largo de un ciclo de 24 hs. Células mononucleares se estimularon con antiCD3/antiCD28 por 48 hs. En el sobrenadante se midió la producción de las distintas citoquinas por ELISA en A) PP y B) GLM. Los resultados se muestran como medias \pm SEM de n=10/horario para PP y n=3-5 para GLM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

La producción de citoquinas mostró variaciones significativas a los distintos tiempos tanto en PP como en GLM. En PP se encontró un aumento significativo tanto de IFN γ como de IL-10 durante la fase oscura aunque el IFN γ precedió a la citoquina regulatoria en 6 horas: el aumento en IFN γ ocurrió al ZT 17 en tanto que IL-10 estuvo aumentada al final de la fase oscura (ZT23). En GLM, las citoquinas anti-inflamatorias mostraron una tendencia a mayores niveles alrededor del ZT5 que fue significativa para la IL-10, para las citoquinas pro-inflamatorias, la producción tuvo una clara tendencia a incrementar al ZT11 y fue significativa para la IL-23 en la fase oscura (Figura 13 B). Los niveles de IL-22 estuvieron incrementados durante la fase lumínica, aunque ésto no fue significativo.

2.8. Análisis Multivariado

Las oscilaciones significativas detectadas en distintos parámetros, especialmente en los GLM, mostraron la influencia de los ritmos biológicos en la homeostasis del sistema inmune de mucosas. Sin embargo el elevado número de variables estudiadas (poblaciones, estados de activación, expresión de moléculas *homing*, producción de distintas citoquinas, señales de reclutamiento) excede los alcances de la estadística convencional. Para subsanar esta limitación y avanzar en la interpretación holística y la comprensión de las implicancias funcionales de la regulación temporal de la inmunidad intestinal planteamos un análisis multivariado. Por este motivo, y con un diseño experimental adecuado (ver M&M), se estudió un conjunto de 17 parámetros entre los que se incluyeron células y mediadores muestreados a los ZT5, 11, 17 y 23 para realizar en primera instancia un análisis de componentes principales (Macpherson & Uhr, 2004) Esta prueba explora un hiperespacio definido por la cantidad total de variables estandarizadas incluidas en el análisis. Como no es posible la realización de una representación clara de este espacio de varias dimensiones, se utiliza un gráfico de bi-plot donde se muestran como componentes principales (Macpherson & Uhr, 2004) los ejes sintéticos que mayor porcentaje de variabilidad total explican. El gráfico resultante del análisis estadístico se muestra en la Figura 14.

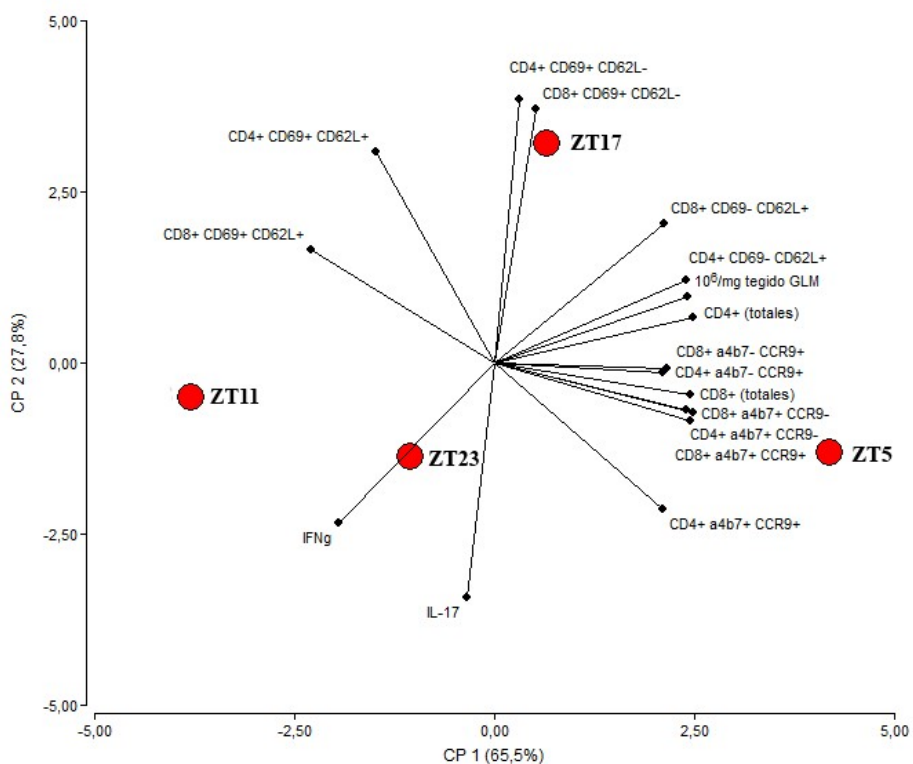


Figura 14. Gráfico de análisis de componentes principales empleando 17 variables clasificatorias evaluadas en GLM de animales WT a 4 tiempos. Gráfico biplot de los dos primeros componentes principales.

Como se observa, el CP1 permitió explicar un 65,5% de la variabilidad total presente en los datos en tanto que el CP2 explicó el 27,8%. De manera interesante, el análisis del conjunto de variables para el total de individuos determinó la distribución en grupos diferentes que se correspondieron con los 4 tiempos de muestreo realizados. En conjunto, este resultado indica que para este sitio inductivo de la mucosa intestinal, la conformación y el microambiente no son los mismos a lo largo del día.

El análisis de componentes principales nos permitió además conocer la contribución en valor absoluto de cada variable sobre los CP1 y CP2 (análisis de autovectores) y seleccionar aquellas de mayor aporte. Así, como se observa en la Tabla 1, la celularidad total $\times 10^6/\text{mg}$ de tejido, el número de células totales CD4^+ y CD8^+ , el número de linfocitos $\text{CD8}^+ \alpha_4\beta_7^+ \text{CCR9}^-$ y $\text{CD8}^+ \alpha_4\beta_7^+ \text{CCR9}^+$ son aquellas variables que más contribuyen al CP1 en tanto que el número de células $\text{CD4}^+ \text{CD69}^+ \text{CD62L}^+$, $\text{CD4}^+ \text{CD69}^+ \text{CD62L}^-$, el número de linfocitos $\text{CD8}^+ \text{CD69}^+ \text{CD62L}^-$ y la IL-17 son las que mayor aporte hicieron al CP2 .

Posteriormente utilizando 4 variables seleccionadas a partir del ACP se realizó un análisis discriminante lineal (ADL). Estas 4 variables se seleccionaron a partir del ACP en función (i) al peso en valor absoluto de cada variable sobre el CP1 y el CP2 y (ii) su relevancia biológica. Así, para el CP1 seleccionamos el número de linfocitos CD4^+ y CD8^+ totales mientras que para el CP2 se seleccionó el número de células $\text{CD4}^+ \text{CD69}^+ \text{CD62L}^-$ y la IL-17. El ADL a partir de estas 4 variables seleccionadas, permitió definir 4 subgrupos con rangos de distribución propios delimitados por las elipses de predicción correspondientes (Figura 15), mostrando que efectivamente a lo largo del día el GLM presenta capacidades funcionales diferentes. Estas diferencias fueron mayores a los ZT5 y 11 hs, mientras que los horarios de transición ZT23 y ZT17 resultaron similares entre sí.

Tabla 1: Valor de autovectores del análisis de componentes principales

Variable	CP1	CP2
10 ⁶ /mg tejido GLM	0,29	0,11
CD4⁺ (totales)	0,29	0,08
CD4⁺ CD69⁺ CD62L⁻	0,04	0,46
CD4 ⁺ CD69 ⁺ CD62L ⁺	-0,18	0,36
CD4 ⁺ CD69 ⁻ CD62L ⁺	0,28	0,14
CD8⁺ (totales)	0,29	-0,05
CD8⁺ CD69⁺ CD62L⁻	0,06	0,44
CD8⁺ CD69⁺ CD62L⁺	-0,27	0,2
CD8⁺ CD69⁻ CD62L⁺	0,25	0,24
CD4⁺ α4β7⁺ CCR9⁻	0,28	-0,08
CD4⁺ α4β7⁺ CCR9⁺	0,25	-0,25
CD4⁺ α4β7⁺ CCR9⁺	0,26	-0,01
CD8⁺ α4β7⁺ CCR9⁻	0,29	-0,09
CD8⁺ α4β7⁺ CCR9⁺	0,29	-0,1
CD8⁺ α4β7⁺ CCR9⁺	0,25	-0,02
IFN_γ	-0,23	-0,28
IL-17	-0,04	-0,4

Correlación cofenética= 0,992; En itálica: variables del CP1 y CP2 seleccionadas para el ADL

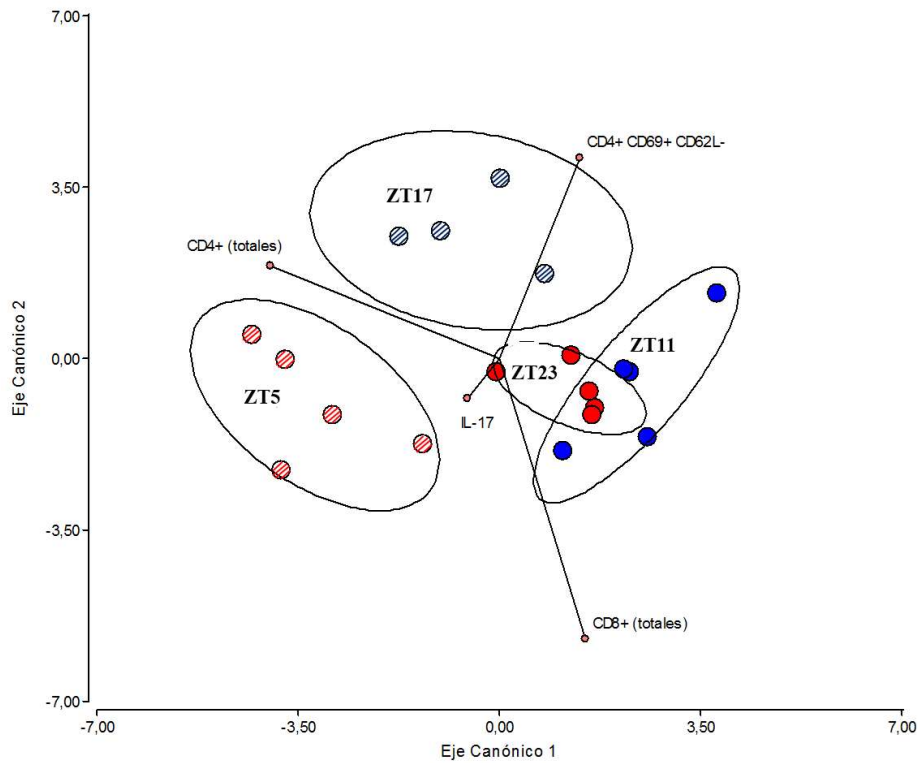


Figura 15. Análisis discriminante lineal para las variables número de linfocitos CD4⁺ totales, CD8⁺ totales, CD4⁺ CD69⁺ CD62L⁻ e IL-17 evaluados a los ZT5, 11, 17 y 23 en GLM. El eje canónico 1 explica el 70,44% de la varianza mientras que el eje canónico 2 explica el 28,1%. En el gráfico se delimitaron con una elipse de confianza los casos de cada ZT.

Por otro lado, a partir del ADL se obtuvo la función discriminante que permite clasificar nuevo casos en uno de los grupos definidos por el análisis (Tabla 2).

Tabla 2. Funciones discriminantes con datos estandarizados.

Variable	Coefficiente EC1	Coefficiente EC2
IL-17	-0,25	-0,37
CD4 ⁺ (totales)	-1,84	0,87
CD8 ⁺ (totales)	0,69	-2,64
CD4 ⁺ CD69 ⁺ CD62L ⁻	0,65	1,88

Así, dado un nuevo caso “X” del que se conozcan los valores de los parámetros IL-17, CD4⁺ totales, CD8⁺ totales y CD4⁺CD69⁺CD62L⁻ en GLM, se podrá clasificar en alguno de los 4 subgrupos según la siguiente expresión matemática:

$$EC1 = (-0,25) \text{ IL-17} + (-1,84) \text{ CD4}^+ \text{ totales} + (0,69) \text{ CD8}^+ \text{ totales} + (0,65) \text{ CD4}^+ \text{ CD69}^+ \text{ CD62L}^-$$

$$EC2 = (-0,37) \text{ IL-17} + (0,87) \text{ CD4}^+ \text{ totales} + (-2,64) \text{ CD8}^+ \text{ totales} + (1,88) \text{ CD4}^+ \text{ CD69}^+ \text{ CD62L}^-$$

Es importante destacar que los coeficientes de la función discriminante encontrados para cada variable analizada presentaron una tasa de error aparente del 5,26% (Tabla 3), lo que da cuenta de la robustez (es decir los estimadores no son afectados por variaciones pequeñas) y la predictibilidad del modelo.

Tabla 3. Clasificación cruzada (tasa de error aparente) de la función discriminante.

Grupo	23	5	11	17	Total	Error (%)
23	5	0	0	0	5	0
5	0	5	0	0	5	0
11	1	0	4	0	5	20
17	0	0	0	4	4	0
Total	6	5	4	4	19	5,26

Por lo tanto, podemos concluir que en condiciones basales el sistema inmune de la mucosa intestinal está influenciado por un reloj biológico local que determinaría diferentes condiciones que podrían afectar la respuesta a distintos estímulos a lo largo del día.

Resultados II

Capítulo 3-Resultados II

La interrupción del reloj circadiano es una característica moderna de la alteración en el estilo de vida y es especialmente evidente en individuos que trabajan en turnos crónicos o en aquellos que viajan con frecuencia a través de distintas zonas horarias, experimentando el fenómeno del "jet lag". Este nuevo conjunto de condiciones disruptivas para la fisiología humana se asocia con una propensión a una amplia gama de enfermedades, incluyendo obesidad, diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, susceptibilidad a infecciones y enfermedades gastrointestinales crónicas como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (Archer et al., 2014; Buxton et al., 2012; Fonken et al., 2010; Suwazono et al., 2008) (Archer y col., 2014, Buxton y col., 2012; Fonken y col., 2010; Scheer y col., 2009; Suwazono y col., 2008). Los mecanismos por los cuales la interrupción de la ritmicidad contribuye a estos efectos fisiopatológicos siguen siendo en gran parte desconocidos.

En intestino existe un delicado balance entre los ciclos de luz-oscuridad, los hábitos alimenticios, la actividad inmune y la microbiota en el mantenimiento de la homeostasis. Varias funciones intestinales como la absorción de nutrientes, la proliferación celular, las respuestas inmunes y las actividades metabólicas están rítmicamente reguladas de manera circadiana (Hussain & Pan, 2009) y alteraciones en los genes que componen el núcleo del reloj circadiano resultan en disbiosis de la microbiota (Christoph A. Thaiss et al.; Robin M. Voigt et al., 2014).

Nos preguntamos si la función inmune intestinal podía resultar alterada por deficiencias en componentes del reloj o cambios en los ciclos de luz-oscuridad. Para abordar este objetivo empleamos dos estrategias:

1. utilización de animales deficientes en *Per2*, uno de los genes del reloj (cepa *Per2*KO), que se mantuvieron bajo condiciones estándares 12:12 LD, y
2. alteración de los ciclos de luz-oscuridad en ratones de la cepa C57BL6 (Johns et al., 2005) con exposición a condiciones de oscuridad continua o luz continua durante 48 hs previas al sacrificio.

3.1. Celularidad y subpoblaciones leucocitarias en sitios inductivos de ratones *Per2KO* a lo largo de 24 hs

En primera instancia para establecer si la ausencia en *Per2* afectaría el número de células inmunes al GLM, se determinó la celularidad a los ZT5, 11, 17 y 23 en GLM de animales *Per2KO* y animales WT, bajo condiciones de luz-oscuridad 12:12 LD.

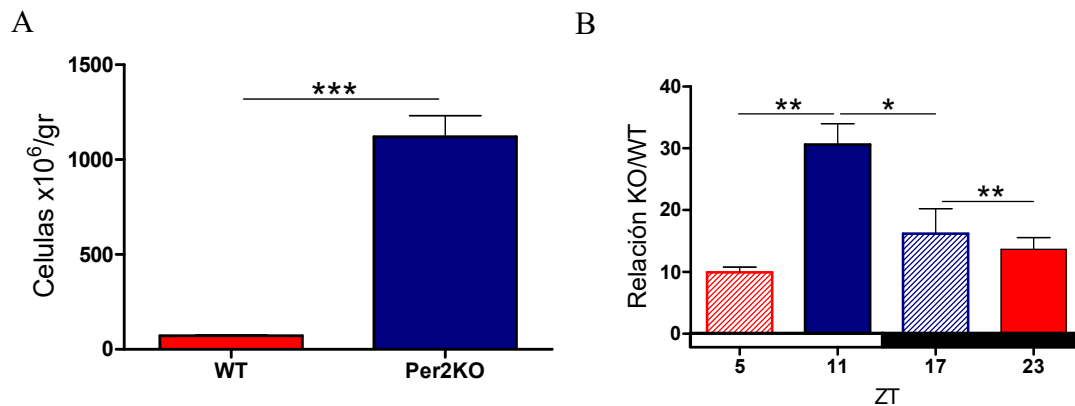


Figura 16. Celularidad en GLM en animales deficientes en *Per2*. A) N° absoluto de células ($10^6/\text{gr}$ tejido) en las cepas *Per2KO* y WT. B) Celularidad (células $\times 10^6/\text{gr}$ tejido) por hora evaluada en animales KO expresada como veces de cambio respecto al WT. En ambos casos los valores se normalizaron considerando el peso del órgano. Los datos son medias \pm SEM de $n=5/\text{horario}$ para KO y $n=11-12/\text{horario}$ en WT. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

La deficiencia en *Per2* modificó la celularidad en GLM, con un significativo aumento en el número absoluto de leucocitos comparado con los ratones WT (Figura 16 A). En ausencia de *Per2* se eliminó el patrón oscilante de comportamiento observado en ratones WT a lo largo de las 24 hs. Tanto en la fase lumínica como en la fase oscura, se observaron aumentos del orden de las 10 veces, y la mayor diferencia se hizo evidente durante la transición al período nocturno (ZT11) (Figura 16B).

Estas perturbaciones también se encontraron en subpoblaciones de células T CD4^+ y CD8^+ presentes en GLM a los distintos tiempos (Figura 17). En ratones *Per2KO* ambas subpoblaciones mostraron un aumento significativo al final de la fase lumínica (ZT11), en

tanto que el número de LT CD4⁺ y CD8⁺ fue menor o similar al de ratones WT en los otros tiempos evaluados.

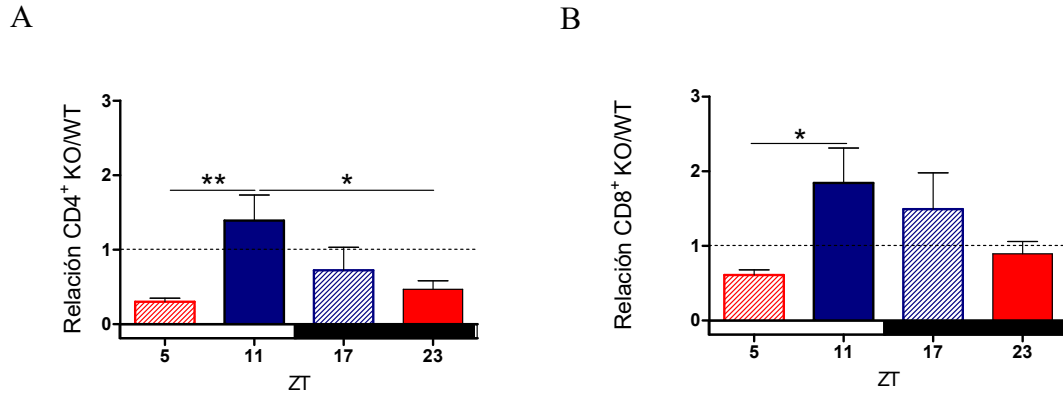


Figura 17. Linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ presentes en GLM de animales KO a distintos tiempos. N° absoluto de linfocitos ($\times 10^6$ células) CD4⁺ (A) o CD8⁺ (B) en GLM a los ZT 5, 11, 17 y 23 en ratones KO y WT. Los valores se normalizaron considerando el peso del órgano y se expresaron como veces de cambio respecto al WT. Los datos son medias \pm SEM de n=5/horario para KO y n=11-12/horario en WT. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Estos resultados muestran que fallas en la integridad del reloj molecular dada por la ausencia de *Per2* ocasiona cambios en el ingreso/egreso de los linfocitos al GLM que son de mayor intensidad al inicio de la fase oscura del ciclo.

3.2. Producción de citoquinas en la mucosa intestinal en animales *Per2KO* a lo largo de 24 hs

Considerando que la frecuencia de linfocitos se vió afectada por la ausencia de *Per2*, indagamos acerca de la función efectora de dichas poblaciones. Para ello, se analizó en el sobrenadante de cultivo de células de GLM estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 la presencia de citoquinas relevantes para la inmunidad de la mucosa (Figura 18).

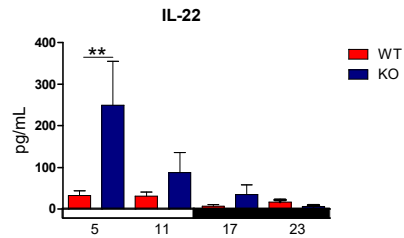
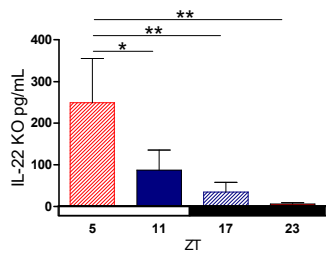
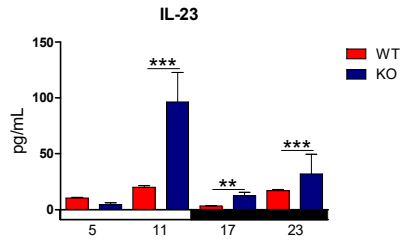
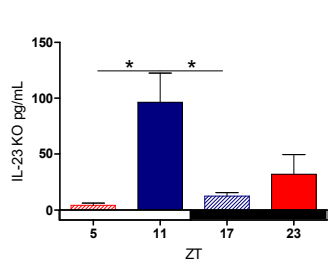
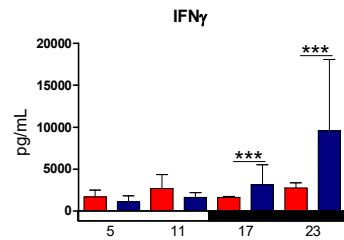
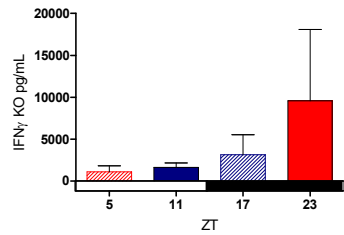
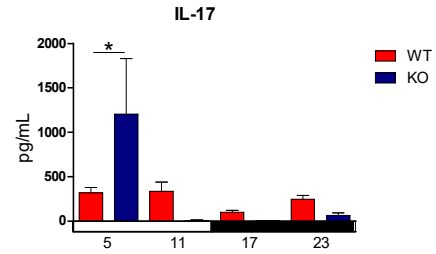
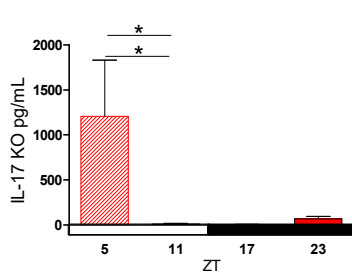
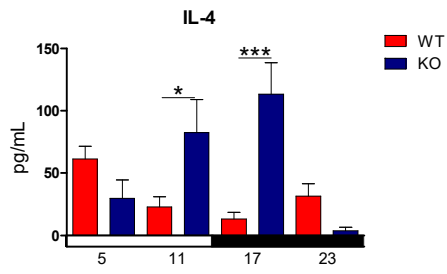
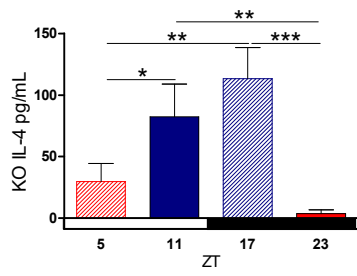


Figura 18. Perfil de citoquinas producidas por ratones Per2KO. Células mononucleares de GLM obtenidas a los distintos tiempos se cultivaron con medio (basal) o en presencia de anti-CD3 /anti-CD28 por 48 hs. En el sobrenadante se midió la producción de IL-4, IL-17, IL-22, IL-23 e IFN γ por ELISA. Los resultados se muestran como media \pm SEM de n=5/horario en ratones Per2KO (izquierda) o en ratones Per2KO y WT (derecha). Los datos son medias \pm SEM de n=5/horario para KO y n=11-12/horario en WT. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.;*** $p<0,001$.

La producción de las citoquinas IL-4 y IL-22 fue mayor en ratones Per2KO a lo largo del día respecto a los animales WT. Sin embargo, los niveles de IL-4 se encontraron significativamente aumentados al final de la fase diurna y principio de la nocturna mientras que citoquinas pro-inflamatorias como IL-17 y la citoquina IL-22 mostraron un perfil de expresión preferentemente diurno (ZT5). La expresión de estas citoquinas a los tiempos mencionados fue significativamente diferente a los niveles encontrados en animales WT.

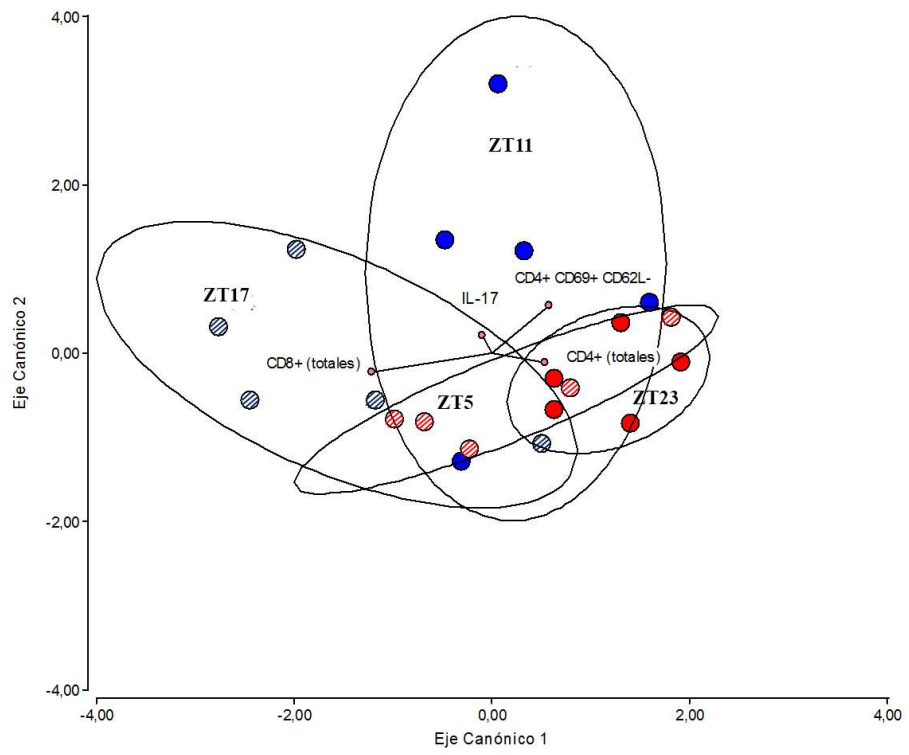
De manera consistente con la modificaciones en celularidad y poblaciones de células T observadas en ratones Per2KO, la deficiencia en el gen del reloj produjo cambios en la producción de mediadores solubles de las células de GLM en respuesta a un estímulo.

3.3. *Análisis Multivariado*

De manera similar a lo descrito en el punto 2.8 con animales WT, se realizó un ALD en animales KO considerando las mismas variables seleccionadas para los WT: CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD69⁺CD62L⁻ e IL-17.

Las agrupaciones resultantes para individuos KO resultaron muy diferentes a las obtenidas con animales WT (Figura 19). Los muestreos a los ZT5 y 23 se parecen más entre sí que los observados para los ZT11 ó 17, a diferencia de lo hallado en ratones WT en donde los horarios de transición (ZT11 y 23) fueron similares mientras que los ZT5 ó 17 resultaron distintos.

A



B

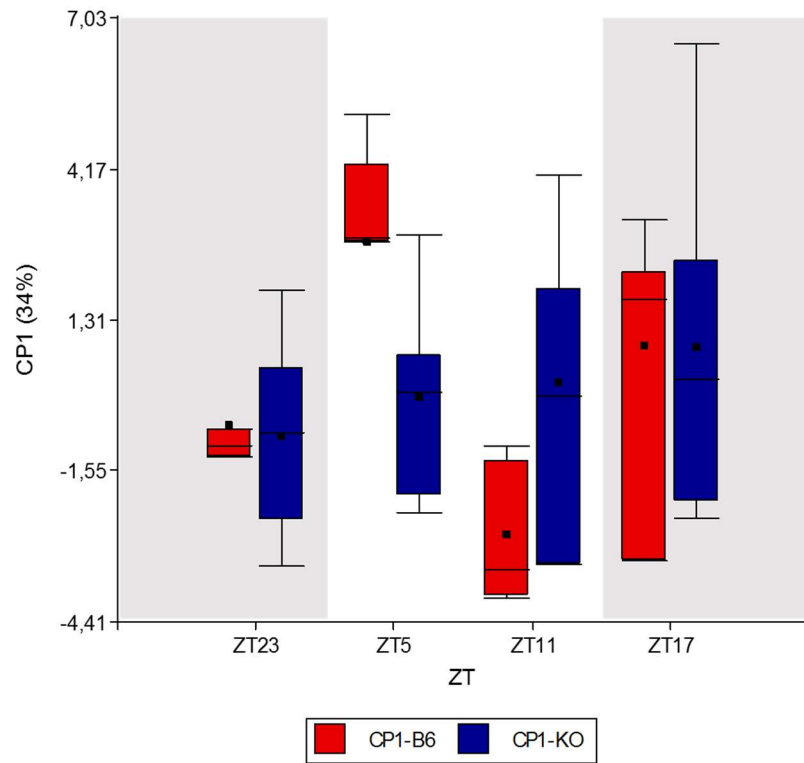


Figura 19. Análisis discriminante lineal de animales deficientes en *Per2*. Se utilizaron las variables número de linfocitos CD4⁺ totales, número de CD8⁺ totales, CD4⁺ CD69⁺ CD62L⁻ e IL-17 evaluados a los ZT 5, 11, 17 y 23 en GLM. El gráfico representa una elipse de confianza para los individuos de una misma hora. El eje canónico 1 explica el 73,12% de la varianza mientras que el eje canónico 2 explica el 26,77%.

Por otro lado la tasa de error aparente dada por la tabla de clasificación cruzada para los animales KO resultó en un 40,0%, significativamente mayor que la observada para animales WT (5,26%). Es decir que la ausencia de un único gen del reloj circadiano (*Per2*) resulta en una menor capacidad predictiva y robustez del modelo que describe el sistema inmune a los distintos tiempos estudiados.

Tabla 3. Clasificación cruzada (tasa de error aparente) de la función discriminante.

Grupo	23	5	11	17	Total	Error (%)
23	3	2	0	0	5	40
5	2	2	0	1	5	60
11	1	1	3	0	5	40
17	0	1	0	4	5	20
Total	6	6	3	5	20	40

Se realizó además un análisis multivariado de la varianza (MANOVA) para animales WT y KO en los distintos horarios para las variables usadas en el ADL (Tabla 4). Se encontraron diferencias significativas entre cepas a los distintos horarios ($p < 0,0001$). Además, en la Tabla 5 se muestran las comparaciones post-test de las distintas variables analizadas.

Tabla 4. Cuadro de Análisis de la Varianza (Lawley Hotelling)

F.V.	Estadístico	F	gl (num)	gl (den)	<i>p</i>
Hora	1,69	3,75	12	80	0,0002
Cepa	2,37	16,62	4	28	<0,0001
Hora*Cepa	2,4	5,34	12	80	<0,0001

Tabla 5. Análisis multivariado de la varianza para animales Per2KO y WT

Hora	Cepa	CD4 ⁺ (totales)	CD8 ⁺ (totales)	CD4 ⁺ CD69 ⁺ CD62L ⁻	IL-17	n	
23	B6	88,87	68,4	2,02	244,55	5	BD
5	B6	193,01	93,32	2,18	317,5	5	A
11	B6	62,23	63,93	2,22	337,55	5	CD
17	B6	147,79	74,79	3,08	79,79	4	AB
23	KO	70,58	64,53	2,1	42,29	5	D
5	KO	96,08	89,51	2,41	80,43	5	CD
11	KO	139,68	124,94	5,21	460,82	5	CD
17	KO	155,73	143,26	3,93	484,08	5	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En ausencia del gen *Per2*, la variabilidad en elementos esenciales de la función inmune fue menor a lo largo del tiempo lo que posiblemente resta plasticidad a la respuesta en la mucosa en esta cepa.

3.4. Cambios en las condiciones ambientales de luz-oscuridad provocan variaciones en las poblaciones linfocitarias en GLM y PP

Alternativamente, para establecer si las oscilaciones celulares encontradas están influenciadas por los regímenes de luz:oscuridad, determinamos celularidad total y subpoblaciones linfocitarias en sitios inductivos en ratones en condiciones estándares de luz-oscuridad (12:12 LD) o expuestos a oscuridad (grupo DD) o luz (grupo LL) constantes 48 hs previas al sacrificio. Cabe señalar que la intensidad de la luz medida en “lux” (unidad derivada del Sistema Internacional de Unidades para el nivel de iluminación) tanto para el grupo LL como para el período de luz del grupo 12:12 LD fue de 360.

En cuanto a celularidad, en PP el recuento fue significativamente menor en todos los tiempos evaluados (Figura 20), mientras que en GLM, si bien el recuento de leucocitos totales fue menor tanto en el grupo DD como en el LL respecto a los animales controles, esta disminución sólo resultó significativa al ZT5 en GLM en los animales del grupo LL ($p < 0,05$).

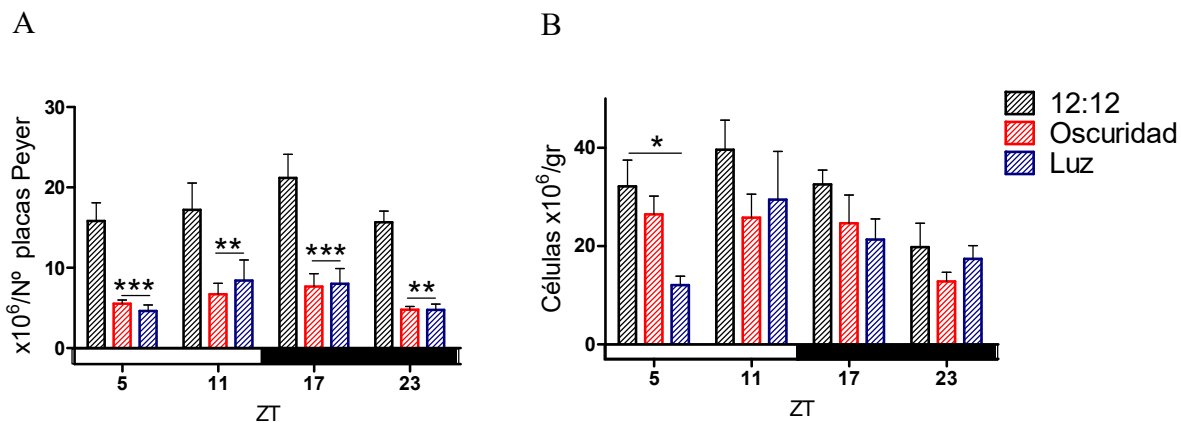


Figura 20. Celularidad en sitios inductivos a lo largo de un ciclo de 24 hs con ciclos de luz-oscuridad alterados. Número absoluto de leucocitos en Placas de Peyer (A) y GLM (B) a los ZT 5, 11, 17 y 23 en ratones WT bajo regímenes estándares de luz:oscuridad (12:12 LD) o bajo condiciones de oscuridad o luz constantes durante 48 hs. Los datos se normalizaron considerando un número de 5 placas/ratón en tanto que para los GLM se usó el peso del órgano. Los datos son medias \pm SEM de $n=7-8$ /horario/condición. * $p<0,05$; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Se estudiaron además las células de la inmunidad adaptativa (Figura 21). Los valores se representaron como relaciones entre DD o LL y 12:12 LD. Notese que los signos de significancia que aparecen en la figura 21 corresponden a la comparación de los números absolutos de las distintas subpoblaciones entre DD o LL y 12:12 LD para cada ZT.

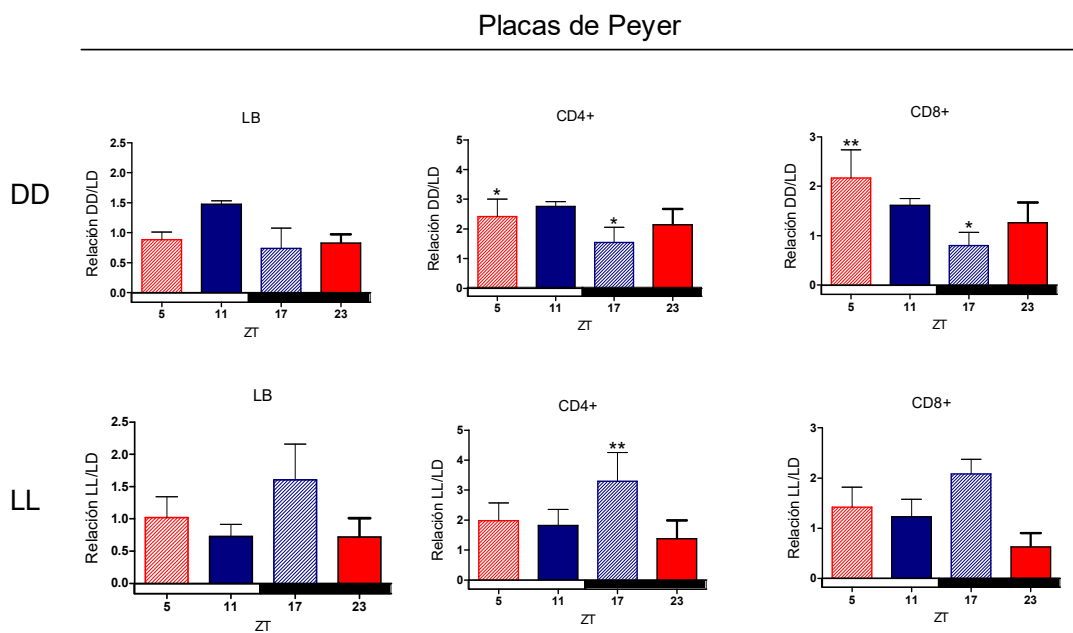
En PP no se observaron cambios en linfocitos CD19⁺, mientras que para linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en tres de los ZT evaluados la abundancia fue mayor luego de la alteración lumínica. Además, se observó un aumento significativo ($p<0,05$) a las ZT5 y ZT17 en CD4⁺ en condiciones DD respecto a 12:12 LD, mientras que en CD8⁺ hubo un aumento significativo al ZT5 en animales expuestos a condiciones constantes de oscuridad.

En tanto que los animales expuestos a luz constantes mostraron un aumento significativo en linfocitos B y CD4⁺ a ZT17.

En GLM sólo se observaron diferencias en la proporción de linfocitos CD19⁺ en condiciones DD a los ZT5 y 23. Para las demás condiciones y subpoblaciones el tratamiento determinó menor número de células en este tejido linfoide (relaciones menores a 1).

En cuanto al análisis estadístico, se observó un aumento significativo de LB (ZT5 y ZT23), una disminución significativa en linfocitos CD4⁺ (a todos los ZT evaluados) y CD8⁺ (ZT5, ZT11 y ZT17) en los animales expuestos a oscuridad constante respecto a los animales 12:12 LD. En animales expuestos a luz constante las células CD4⁺ y CD8⁺ se comportaron de manera similar disminuyendo significativamente en todos los tiempos evaluados, mientras que los linfocitos B disminuyeron al ZT11 y aumentaron al ZT23.

A



B

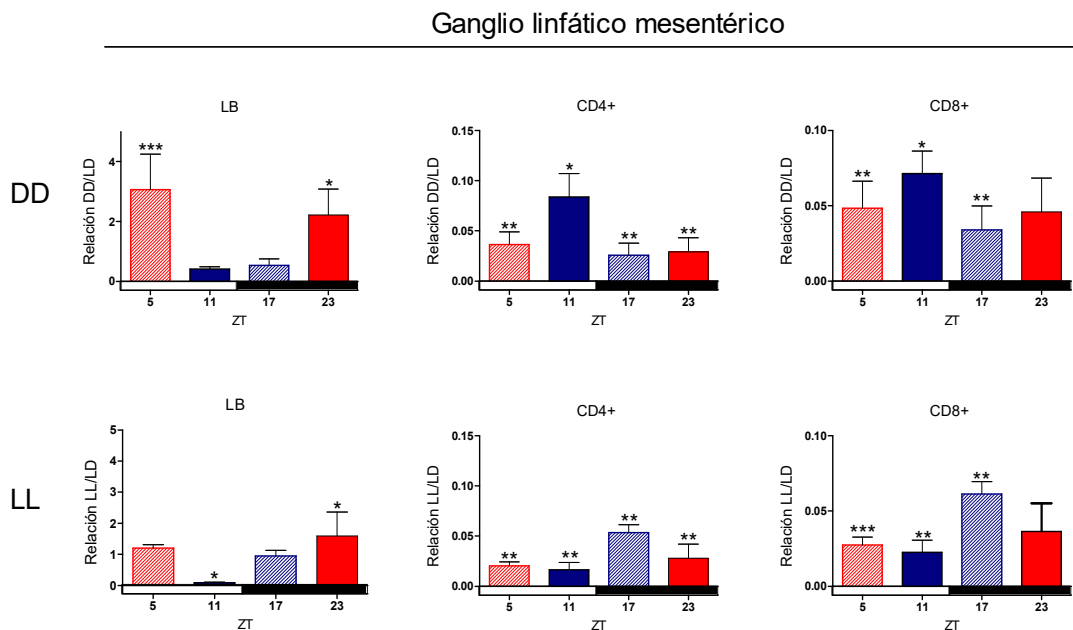


Figura 21. Poblaciones linfocitarias en animales expuestos a oscuridad (DD) y luz continuas (LL). Se evaluaron las poblaciones de linfocitos B CD19⁺ y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en PP (A) y GLM (B) de ratones WT a los ZT5, 11, 17 y 23 bajo regímenes estándares de luz:oscuridad 12:12 LD, oscuridad (DD) o luz (LL) constantes durante 48 hs. Los datos se normalizaron considerando un número de 5 placas/ratón y el peso del órgano para los GLM y se representaron como veces de cambio respecto a animales 12:12 LD por hora. n=3/horario/condición. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de la comparación entre número absoluto de DD o LL versus 12:12 LD a cada ZT.

3.5. Producción de mediadores de relevancia en la inmunidad intestinal

Se determinó también a los 4 tiempos y bajo la condición de LL o DD la presencia de distintos mediadores solubles importantes en la inmunidad en mucosa intestinal. En cultivo de explanto de secciones representativas de intestino delgado se evaluó la quimioquina proinflamatoria MCP-1 (CCL2) (Figura 23). Se encontraron niveles aumentados de esta quimioquina al inicio de la fase nocturna (ZT11) en todas las condiciones de luz-oscuridad estudiadas.

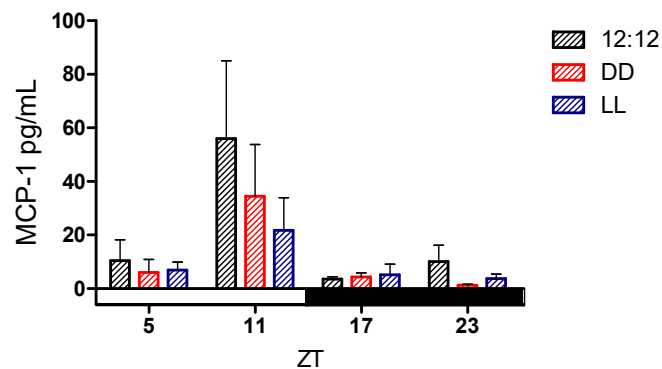


Figura 22. Producción de quimioquinas en intestino delgado. Niveles de MCP-1 (CCL2) en cultivo de explanto de yeyuno determinadas mediante ELISA en animales 12:12 LD, DD y LL a los ZT5, 11, 17 y 23 hs. Los datos se expresaron como medias \pm SEM de n=3/horario/condición.

Se midió también la producción de óxido nítrico (ON) en los sobrenadantes de cultivo de explantos por medio de un método colorimétrico (Reacción de Griess). La producción de ON se limitó al intestino grueso y como se observa en la Figura 23, para la condición 12:12 LD los valores estuvieron significativamente incrementados (más de 10 veces) a los ZT11 y

ZT23 ($p < 0,001$) en relación a los ratones expuestos a LL o DD a lo largo del día. Como se observa en la figura la perturbación en las condiciones lumínicas determinó menor producción del mediador y cambios en la ritmicidad con aumento solamente al ZT17.

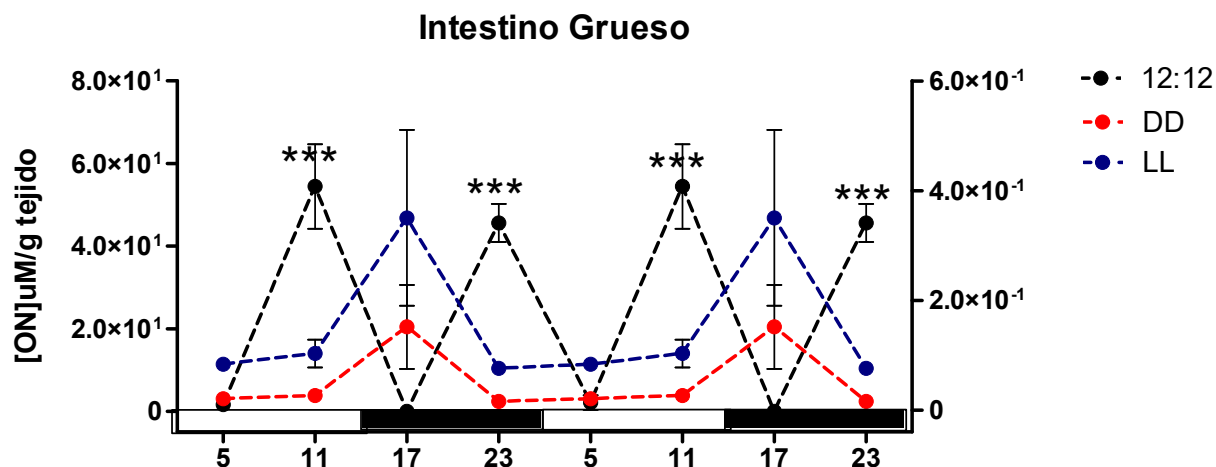


Figura 23. Determinación de ON evaluados en colon de animales 12:12 LD, DD y LL mediante la Reacción de Griess. Los datos se muestran como medias \pm SEM de un $n=3-4$ /hora. Los valores para los animales 12:12 LD corresponden al eje de la izquierda mientras que para los animales DD o LL corresponden al de la derecha. *** $p < 0,001$.

También estudiamos los niveles de producción de mucus para establecer si este componente de la barrera protectora física oscila a lo largo de día. Mediante un ensayo colorimétrico adaptado de la bibliografía (ver M&M), estudiamos los niveles de mucinas totales en secciones de intestino delgado y grueso obtenidas a los ZT5, 11, 17 y 23 de animales WT mantenidos en condiciones 12:12 LD, DD o LL constantes por 48 hs. Además, el patrón de producción de mucinas se encuentra alterado en los grupos DD y LL respecto a los animales 12:12 LD en intestino delgado ($p < 0,05$).

Estos resultados muestran que la producción de mediadores claves para la homeostasis responde a patrones rítmicos locales y sugiere que señales del ambiente que modifican los relojes centrales pueden afectar la liberación de los mismos.

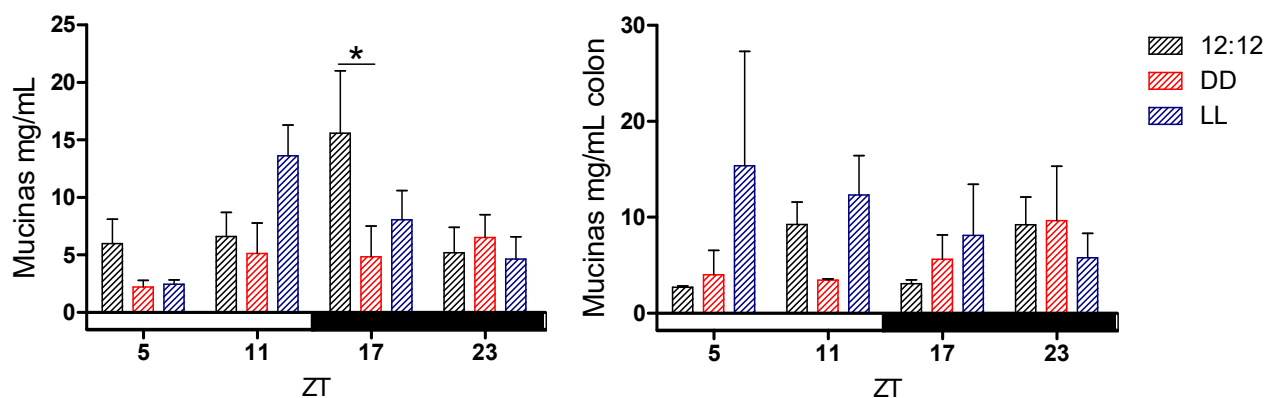


Figura 24. Determinación de mucinas a lo largo de un ciclo de 24 hs. Evaluación colorimétrica de muestras representativas de yeyuno (A) y colon (B) evaluadas a los ZT5, 11, 17 y 23 en animales 12:12 LD, DD y LL. Los resultados se expresan como media \pm SEM, $n=3-4$ /hora/condición. $*p<0,05$.

3.6. Morfología del intestino delgado y grueso a lo largo del día.

Nos preguntamos entonces si los cambios en los períodos de luz-oscuridad producirían modificaciones a nivel histológico en la mucosa intestinal. Para ello analizamos la morfología de secciones representativas de intestino delgado y grueso teñidas con ácido periódico de Schiff/Alcian Blue (PAS/AB) o Azul de Toluidina (AT).

En la Figura 25 se muestra la arquitectura del duodeno de animales controles 12:12 LD, DD y LL (PAS/AB) a los ZT5 y 23; en animales 12:12 LD se observó mayor abundancia de canales prelinfáticos al finalizar la fase oscura y contracción de la lámina propia, con presencia de espacios subepiteliales al ZT23. Estas modificaciones no fueron evidentes al ZT5. En cambio en ratones LL la contracción de la lámina propia persistió a los dos horarios. Cambios similares fueron observados en secciones de yeyuno e íleon.

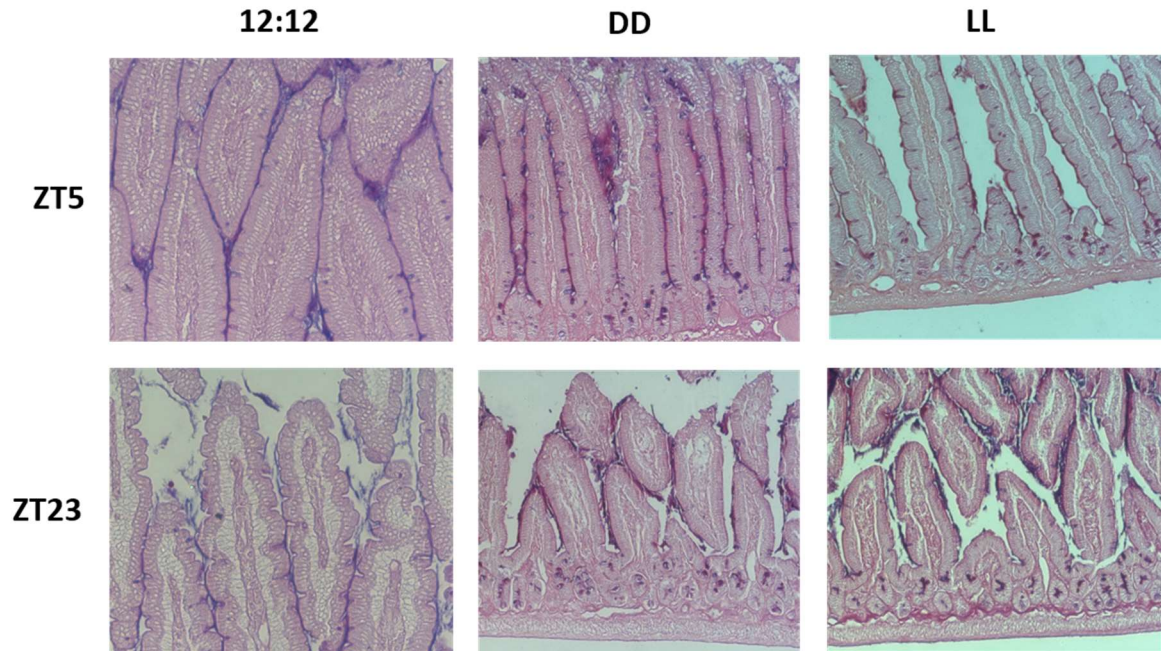


Figura 25. Evaluación histológica de muestras representativas de duodeno a los ZT5 y 23 en animales expuestos a condiciones estándares de luz-oscuridad 12:12 LD, DD o LL continua 48 hs previas al sacrificio. Las flechas muestran el espacio subepitelial. Muestras representativas teñidas con PAS-Alcian Blue (20x).

Las 48 hs de exposición a oscuridad y luz continua repercutieron marcadamente sobre la histoarquitectura del intestino delgado. Como se observa en cortes teñidos con el colorante AT en la Figura 26, comparando con la morfología de ratones 12:12 LD, las secciones de animales expuestos a LL o DD mostraron al ZT23 una intensa vacuolización no sólo en la lámina propia sino también en el interior de los enterocitos. Al ZT11 (Figura 27), las vellosidades intestinales mostraron además indicios de un proceso de degeneración tisular (flechas rojas) en el epitelio. De manera interesante, en esta condición también se encontraron numerosas células plasmáticas en la lámina propia.

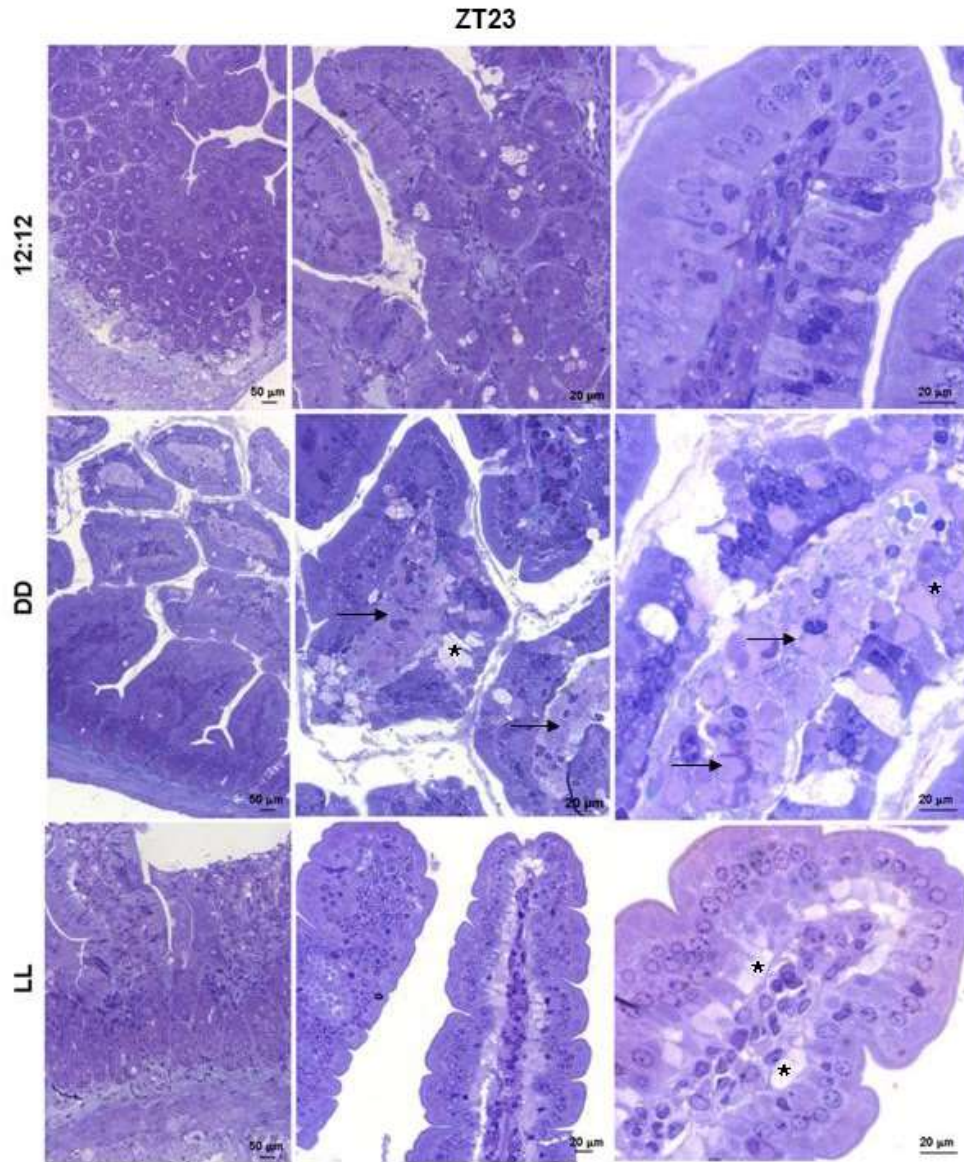


Figura 26. Duodeno ZT23. Microfotografía de vellosidades intestinales teñidas con azul de Toluidina en las diferentes condiciones experimentales. Aspecto morfológico normal del duodeno en el grupo 12:12 LD. Los grupos DD y LL presentan intensa vacuolización del epitelio intestinal (*) y de la lámina propia (flechas).

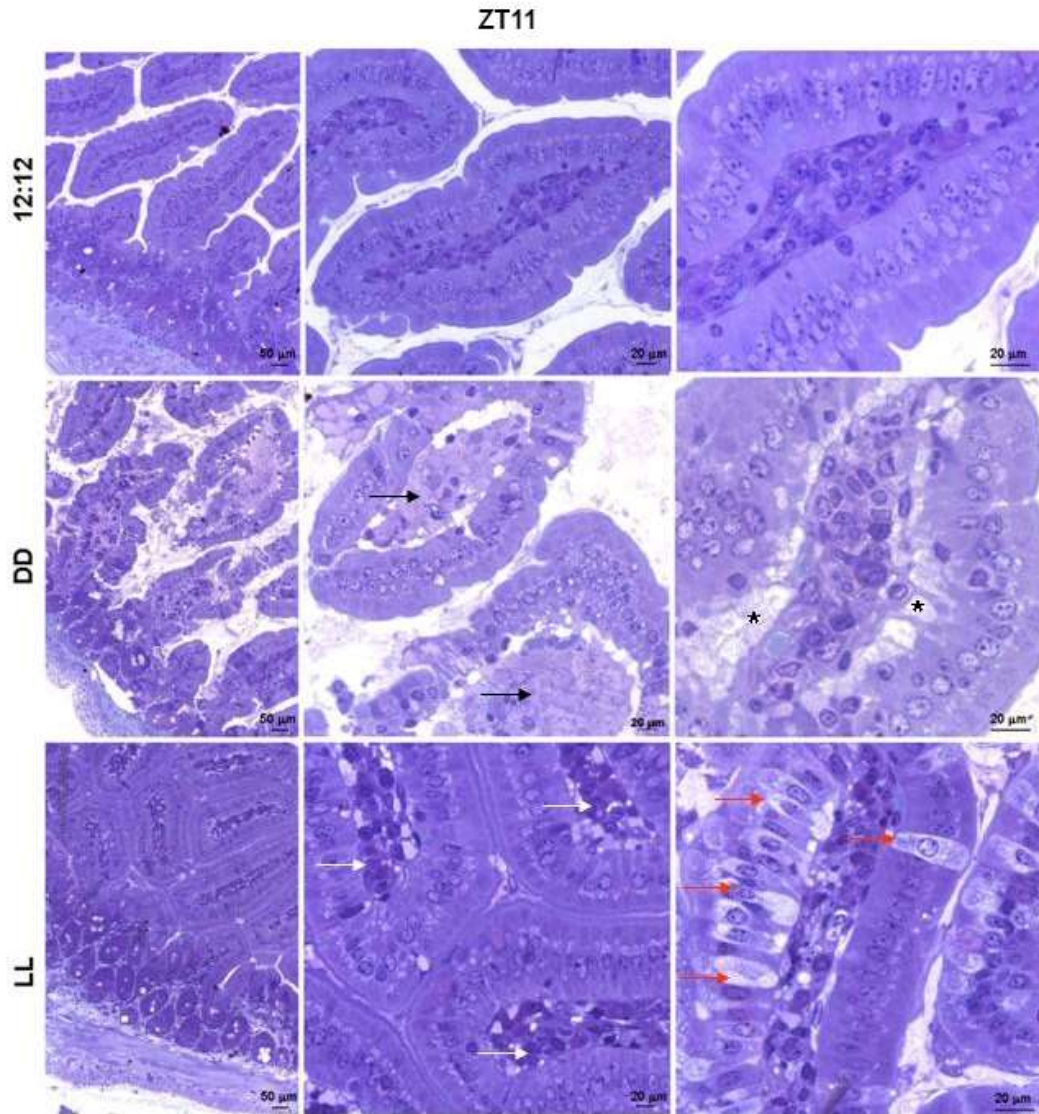


Figura 27. Duodeno ZT11. Microfotografía de vellosidades intestinales teñidas con azul de Toluidina en las diferentes condiciones experimentales. Aspecto morfológico normal del duodeno en el grupo 12:12 LD. El grupo DD presenta intensa vacuolización del epitelio intestinal (*) y de la lámina propia (flechas). El grupo LL presenta numerosas células plasmáticas en la lámina propia (flechas blancas) y el epitelio en proceso de degeneración (flechas rojas).

Debido a que en la condición LL se observaron los mayores cambios, realizamos un análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión en muestras representativas de animales LL a los 4 tiempos de estudio. En muestras representativas del duodeno al ZT5 los enterocitos se encontraron en proceso de muerte celular con

numerosas vacuolas y mitocondrias en proceso degenerativo (Figuras 28 y 29). Estas observaciones fueron similares a los ZT11, 17 y 23 para la misma condición.

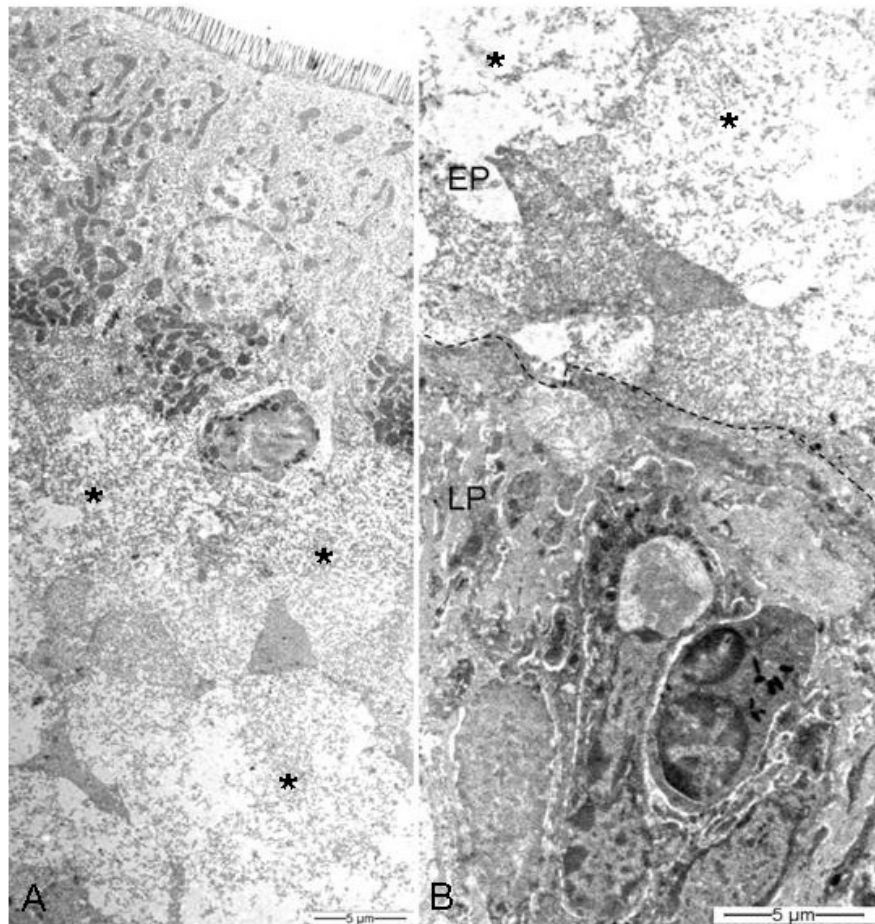


Figura 28. Duodeno ZT5 en grupo LL. Microfotografía electrónica del epitelio y de la lámina propia. (A) Epitelio en degeneración evidenciada por la presencia de vacuolas (*). (B) Detalle de la región de interfase entre el epitelio vacuolizado (EP, *) y la lámina propia (LP). Lámina basal (LB ---).

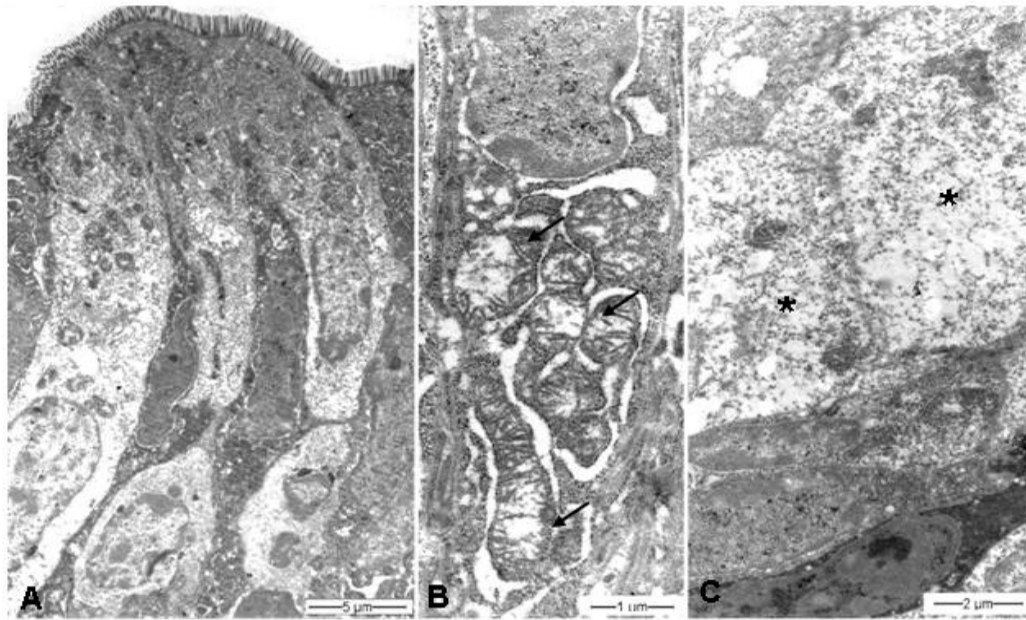


Figura 29. Duodeno ZT5 en grupo LL. (A) Microfotografía electrónica del epitelio y de la lámina propia. (B) Detalle de enterocito evidenciando alteración mitocondrial (flechas). (C) Presencia de vacuolas (*) en el epitelio intestinal.

Por otro lado, también se estudiaron a nivel de intestino grueso cambios en la distribución/ expresión de mucinas neutras y ácidas a lo largo del día. En secciones representativas de colon con la tinción de PAS/AB se pudo observar que en animales 12:12 LD, las mucinas ácidas teñidas de color azul profundo (AB) se distribuyen principalmente sobre la parte inferior del tejido, a nivel de las criptas; mientras que las mucinas neutras teñidas de magenta brillante (Hellwig, Passante, & Rehm) se encuentran en la parte superior, en dirección hacia el lumen (Figura 30). Este patrón de distribución se mantuvo a lo largo del tiempo en animales 12:12 LD. Cuando se modificaron las condiciones estándares de luz y oscuridad, se observaron alteraciones en los patrones de distribución de las mucinas ácidas y neutras. En animales DD y LL, se observó una mayor producción de mucinas neutras (PAS⁺) que fue notoriamente mayor a los ZT11 y 23.

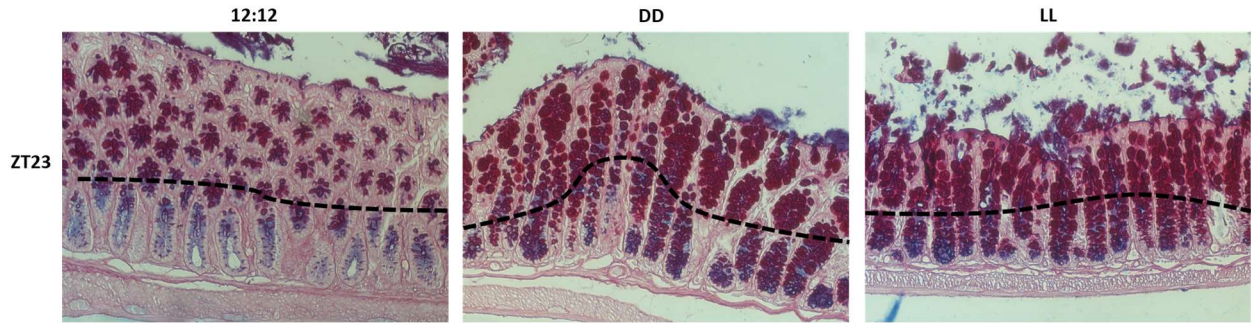


Figura 30. Mucinas ácidas y neutras a lo largo de un ciclo de 24 hs. Evaluación histológica de muestras representativas de colon coloreadas con PAS-AB a l ZT 23 en ratones 12:12 LD; DD y LL.

Los resultados del estudio morfológico muestran que ocurren cambios temporales fisiológicos en animales 12:12 LD que posiblemente se relacionen con los tiempos de alimentación. De manera interesante, 48 hs continuas de perturbación en los ciclos de luz-oscuridad provocaron diversos cambios en segmentos del intestino delgado y grueso con vacuolización, alteraciones mitocondriales y degeneración tisular. Estas modificaciones podrían provocar la pérdida de integridad de la barrera epitelial y afectar las funciones fisiológicas del tracto comprometiendo la homeostasis de la inmunidad intestinal.

Resultados III

Capítulo 4. Resultados III

En los Capítulos previos se describieron oscilaciones en diferentes parámetros de la inmunidad intestinal en un período de 24 hs, así como la pérdida o modificación de estas variaciones circadianas en animales deficientes en un gen del reloj o expuestos a condiciones de luz u oscuridad continuas. La mucosa intestinal es el sitio de residencia del mayor compartimiento de células del sistema inmune, y se caracteriza por la capacidad de desarrollar respuestas protectoras contra los patógenos e inducir mecanismos de tolerancia hacia microorganismos comensales y antígenos de la dieta. Esta dualidad es el resultado de propiedades de la mucosa intestinal entre las cuales se destaca la abundancia de singulares CPA, como las CDi, que tienen propiedades fenotípicas y funcionales únicas (De Calisto, Villablanca, & Mora, 2012; Tamoutounour et al., 2012). Si bien están presentes a lo largo de todo el intestino (lámina propia, PP, folículos linfoides difusos y GLM) las CDi no constituyen una población homogénea sino que se diferencian en varias subpoblaciones en base a su ontogenia, propiedades de *homing*, capacidad de procesar antígenos y marcadores de superficie. Un marcador muy importante de las CDi es la integrina CD103 (αE), que media la adhesión a E-cadherina, molécula expresada en la superficie basolateral de las células epiteliales y que caracteriza a las células migratorias. Estas CDi CD103⁺ son claves en la inducción de la tolerancia a antígenos orales y expresan enzimas que generan metabolitos como el AR cuya actividad biológica es esencial para la inmunidad intestinal.

Nos preguntamos entonces si las oscilaciones descritas en el capítulo I de resultados podrían afectar la tolerancia oral, la respuesta efectora más crítica de la mucosa intestinal. Para abordar esta premisa consideramos los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar señales del tráfico, microambiente de citoquinas y el fenotipo de CDi en los vasos linfáticos aferentes al GLM a lo largo de 24 hs.
2. Determinar la capacidad de las CDi a lo largo de 24 hs de inducir receptores *homing* y el factor de transcripción Foxp3⁺ sobre células CD4⁺.
3. Establecer la influencia de los ritmos biológicos en la inducción de la tolerancia oral.

4.1. Señales en vasos linfáticos aferentes a los GLM a lo largo de 24 hs

Las quimioquinas y sus receptores son mediadores claves del tráfico leucocitario direccionando su migración hacia y desde los tejidos linfoides. Además, su disponibilidad está sujeta a controles moleculares no del todo caracterizados. En los últimos años, se ha destacado la importancia de receptores atípicos expresados por células estromales que actúan a modo de *scavenger* eliminando las quimioquinas inflamatorias, evitando el congestionamiento de los linfáticos y favoreciendo la migración selectiva de CD a los tejidos linfoides secundarios (McKimmie et al., 2013).

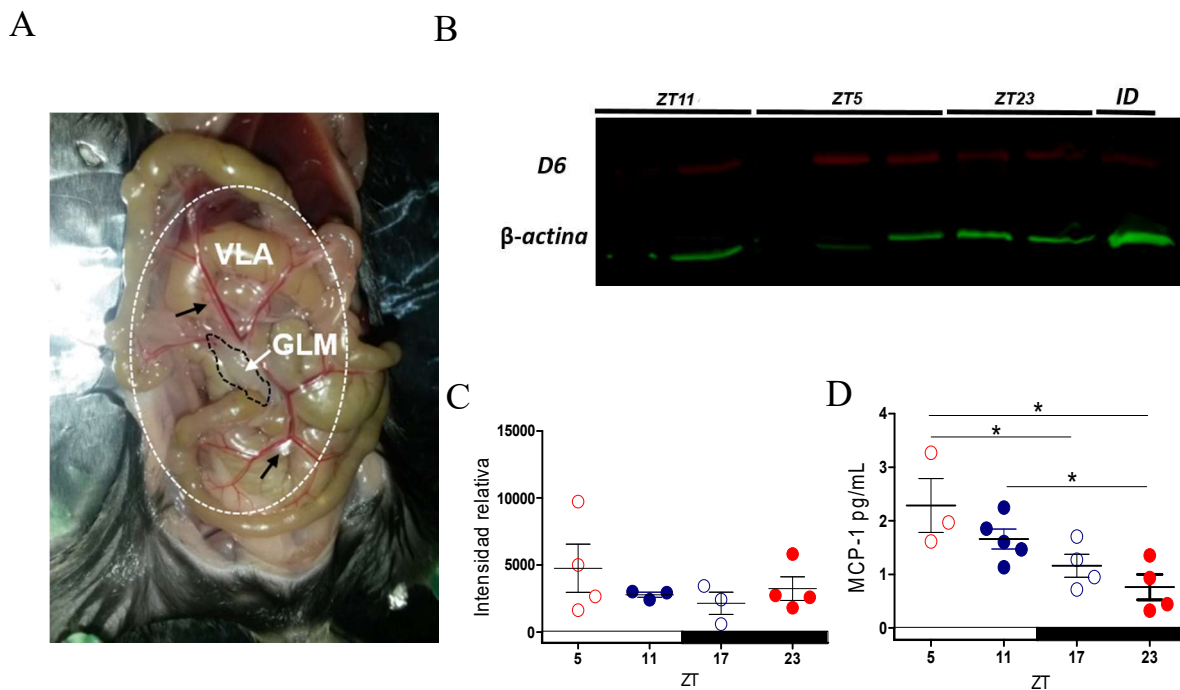


Figura 31. Señales quimioattractantes en los linfáticos aferentes al GLM a los ZT 5, 11, 17 y 23 en ratones WT normales. A) Fotografía representativa de los vasos linfáticos aferentes (flechas negras) a los GLM (flecha blanca). B) El receptor “decoy” D6 se determinó en homogenato de vasos linfáticos (Western blot); C) La intensidad de las bandas de D6 se normalizó con la expresión de β -actina. D) Niveles de CCL2 (MCP-1) en sobrenadante de cultivo de vasos aferentes (Bellet et al.) (Bellet et al.). Los datos son medias \pm SEM de n=3-4 /horario. * $p < 0,05$.

Estudiamos entonces si alguna de las señales que participa del tráfico hacia GLM varía a lo largo del día. Para ello se removió la red de linfáticos aferentes de ratones WT mantenidos

en condiciones estándares de 12:12 LD (Figura 31 A) y se cultivó para evaluar la producción de la quimioquina inflamatoria CCL2 (MCP-1) o se homogeneizó para determinar la expresión del receptor scavenger D6. Como se muestra en la Figura 31 B y C, se produjo un leve aumento en la expresión de D6 al ZT5 que disminuyó al ZT17, previo al inicio de la fase oscura. En cuanto a MCP-1, los niveles estuvieron significativamente aumentados al ZT5 (Figura 31 D).

4.2. Citoquinas en linfáticos aferentes a lo largo de 24 hs

El microambiente de citoquinas es crítico para la homeostasis y puede condicionar la respuesta inmune local a través de la estimulación de las CPA; por lo tanto, a los distintos tiempos de estudio evaluamos en linfáticos aferentes, los niveles de IL-10, un mediador regulatorio clave en la inmunidad intestinal e IL-6, una citoquina cuya actividad depende del contexto inflamatorio (Bamias & Cominelli, 2016; Shan et al., 2013).

Como se observa en la Figura 32, se detectaron niveles levemente incrementados de IL-6 durante la fase nocturna del ciclo (ZT17), mientras que los niveles de IL-10 permanecieron constantes a lo largo del día.

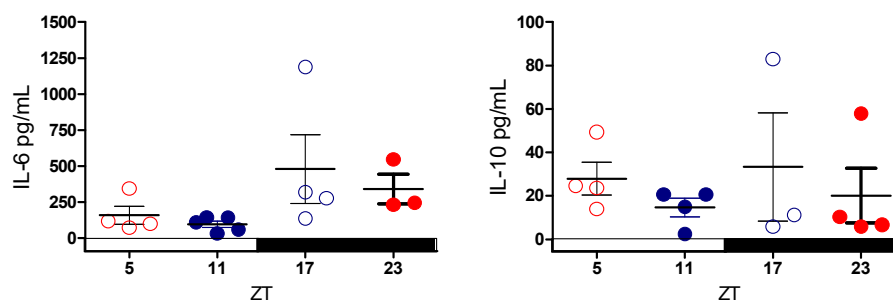


Figura 32. Caracterización de citoquinas presentes en los vasos aferentes linfáticos al GLM. Se determinó la presencia de IL-10 e IL-6 en cultivo de los vasos aferentes en animales mantenidos bajo condiciones estándares de luz-oscuridad a los ZT5, 11, 17 y 23. Los resultados se expresan como medias \pm SEM de $n=4$ /horario. * $p<0,05$.

4.3. Variaciones en las CPA presentes en GLM y linfáticos aferentes a lo largo del día

La inducción de tolerancia requiere de un flujo continuo de antígenos hacia los GLM. Este *delivery* de antígenos está dado principalmente por CPA profesionales que expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CMH-II⁺) y que migran por los vasos linfáticos aferentes desde la lámina propia hacia los GLM en donde se induce la activación antígeno-específica de poblaciones regulatorias de linfocitos T. Por esta razón evaluamos a distintos tiempos en los GLM, células con alta expresión de CMH-II (Figura 33). Encontramos que el número absoluto de CPA CMH-II⁺ no es constante a lo largo del día. Más aún, se produce un aumento significativo en estas células hacia el final de la fase diurna (ZT11), que coincide con el inicio de la fase de mayor actividad de los animales.

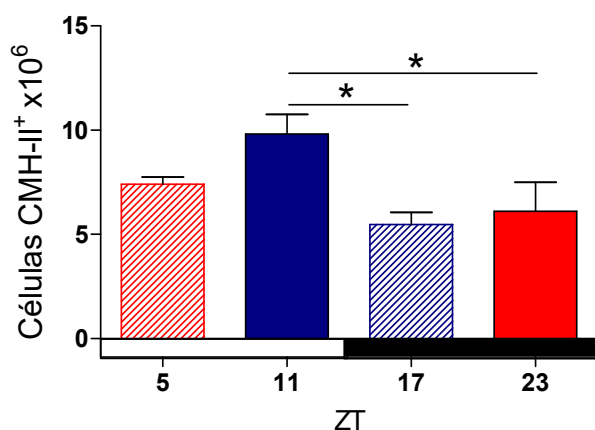


Figura 33. Número absoluto de células presentadoras de antígeno en GLM a lo largo de un período de 24 hs. Se analizó la población de células CMH-II⁺ en animales WT mantenidos en condiciones estándares de luz-oscuridad mediante citometría de flujo. Los datos se expresaron como N° absoluto x 10⁶ y se normalizaron por gramo de tejido; medias ± SEM de n=5/horario.* $p < 0,05$.

Además, caracterizamos las poblaciones de CPA en tránsito hacia los GLM utilizando el protocolo descrito en M&M. Esta estrategia minimiza la manipulación que provoca cambios en el estado de activación de las CPA y nos permitió determinar la frecuencia de células que expresan los marcadores CD11c y CD11b (Figura 34 A). Encontramos que la proporción de CDi CD11c⁺ CMH-II⁺ presentes en los vasos linfáticos es significativamente mayor durante la noche ($p < 0,05$), en el momento de alimentación de los animales (Figura 34 B).

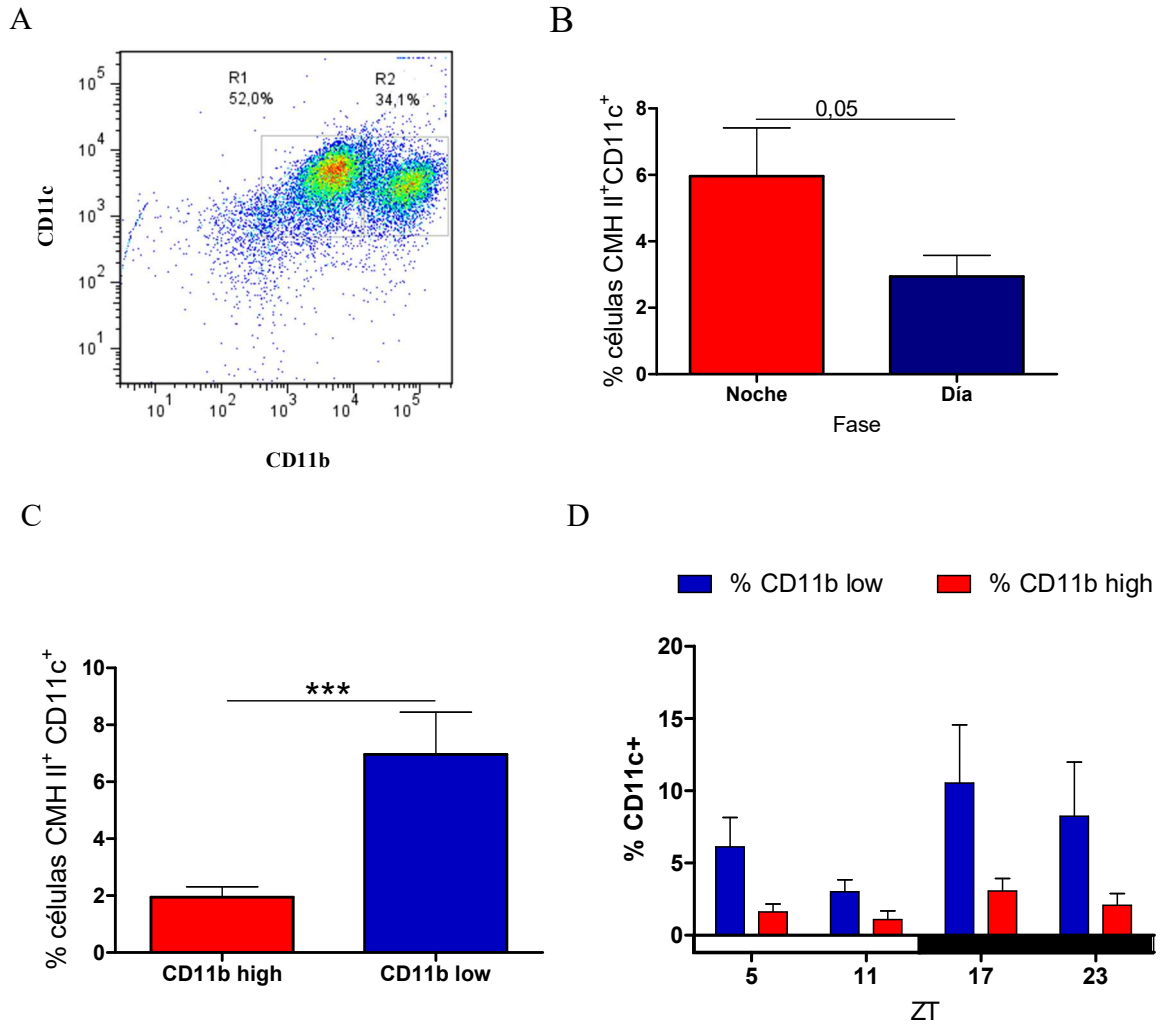


Figura 34. Células presentadoras de antígeno en linfáticos aferentes a lo largo de las 24 hs. Se analizó la población de células CD11c⁺ y CD11b⁺ en animales WT mantenidos en condiciones estándares de luz-oscuridad mediante citometría de flujo a los ZT5, 11, 17 y 23. A). Estrategia de gate utilizada en el análisis de poblaciones. B) Proporción de células presentadoras de antígeno CMH-II⁺ CD11c⁺ durante la fase oscura (ZT17 y 23) o lumínica (ZT5 y 11). C) Proporción de CDi CD11c⁺ CD11b^{low} (R1) y CD11c⁺ CD11b^{high} (R2) evaluados a lo largo de 24 hs. D) Proporción de CDi CD11c⁺ CD11b^{low} (R1) y CD11c⁺ CD11b^{high} (R2) a los distintos ZT estudiados. Medias ± SEM de n=12/horario. *** $p < 0,05$.

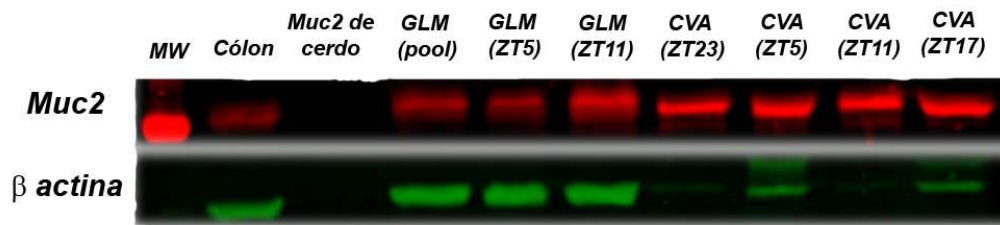
Durante el lapso de un día, la frecuencia de CDi CD11c⁺CD11b^{low} (R1) fue mayor respecto a las CD11c⁺ CD11b^{high} (R2) (Figura 34 C). Sin embargo, las variaciones en la frecuencia de CDi CD11c⁺ CD11b^{low} (R1) no fueron estadísticamente significativas a los distintos tiempos evaluados, mientras que la subpoblación CD11c⁺ CD11b^{high} (R2) se mantuvo constante a lo

largo de las 24 hs (Figura 34 D). Este comportamiento diferencial entre ambas poblaciones de CDi podría estar directamente relacionado con el rol específico de cada población en la inmunidad de mucosas (Denning et al., 2011).

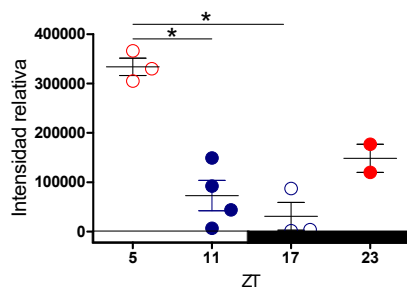
4.4. Caracterización de CDi tolerogénicas en linfáticos aferentes a lo largo de 24 hs

En condiciones homeostáticas, el transporte de antígenos hacia los GLM está dado principalmente por CDi CD103⁺CCR7⁺. Estas células involucradas en la inducción de tolerancia exhiben además características adicionales como activación constitutiva de la vía β -catenina/Wnt, expresión de mediadores anti-inflamatorios como IL-10 y TGF β , alta actividad de la enzima RALDH, y vacuolas conteniendo la proteína Muc-2 y bacterias luminales (Shan et al., 2013). Muc-2 atenuaría la inmunogenicidad de los antígenos intestinales impidiendo la transcripción génica de citoquinas proinflamatorias.

A



B



C

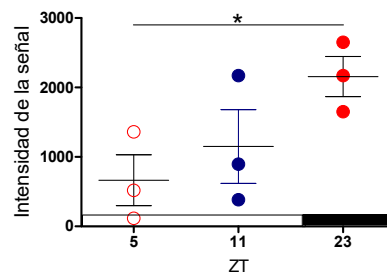


Figura 35. Muc-2 en células totales de vasos linfáticos y GLM a los ZT5, 11, 17 y 23 en ratones WT. (A) Se aislaron las células de linfáticos aferentes (como se describió en la Figura 33) y de GLM y se evaluó la presencia de Muc-2 mediante Western blot. Se utilizó homogenato de colon como control positivo y Mucina tipo II de cerdo para control de especificidad del anticuerpo. (B) Intensidad de las bandas para

Muc-2 en células de vasos linfáticos (B) y GLM (C). se sembraron 40 µg de proteínas totales por carril. Los valores se normalizaron con la expresión de β-actina y se expresaron como medias ± SEM de n=2-4/horario.. * $p < 0,05$.

En base a estos antecedentes, evaluamos a los distintos tiempos en células totales de linfáticos aferentes y GLM la presencia de Muc-2 por Western blot. En la Figura 35 A se muestra un ensayo representativo en el que se incluyeron Muc-2 de cerdo (para verificar la especificidad del anticuerpo), raspado de colon (control +), un *pool* de GLM así como muestras por cada horario. Observamos que el contenido de Muc-2 en células de linfáticos aferentes tuvo un aumento significativo al ZT5 (Figura 35 B) en tanto que en GLM, los mayores niveles de mucus se encontraron al ZT23 (Figura 35 C).

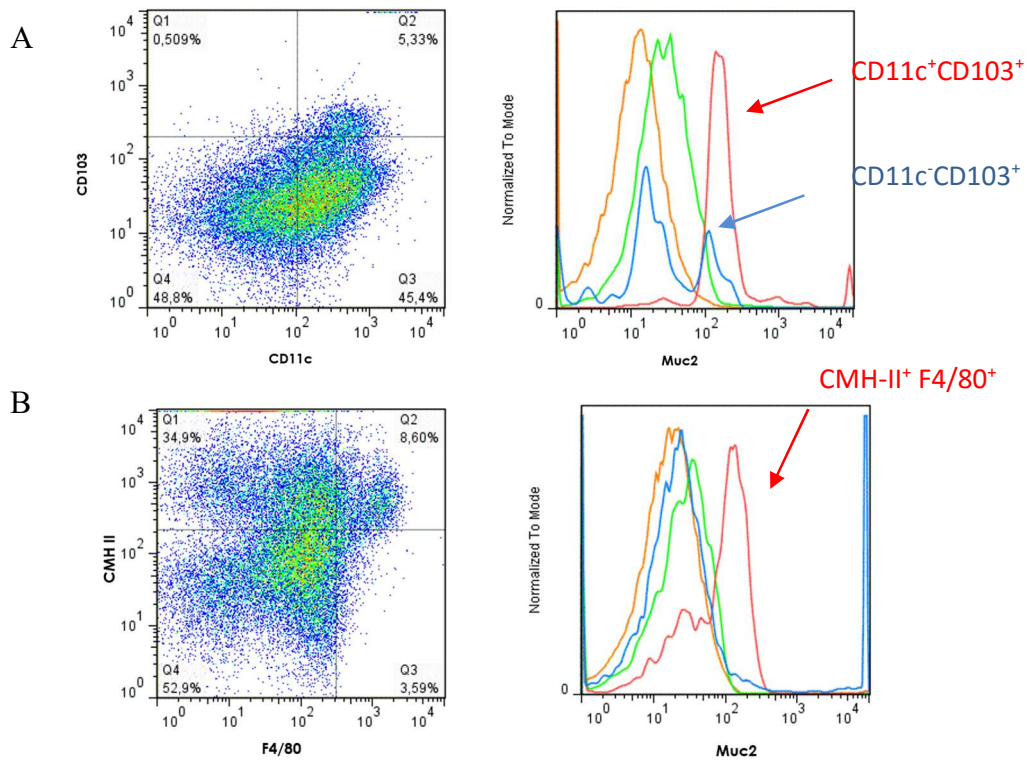


Figura 36. Caracterización fenotípica de CPA Muc-2+ presentes en vasos linfáticos aferentes al ZT5. Dotplots representativos para Muc-2 intracelular en (A) CDi CD11c⁺CD103⁺ y (B) macrófagos CMH-II⁺F4/80⁺CX₃CR1⁺ determinado por citometría de flujo.

Para caracterizar qué CPA presentes en linfáticos aferentes están transportando Muc-2 al GLM identificamos las CDi con los marcadores CMH-II, CD11c, y CD103 y los macrófagos mediante los marcadores CMH-II, F4/80 y CX₃CR₁; y en cada una de estas poblaciones evaluamos la presencia de Muc-2 intracelular por citometría de flujo.

En la Figura 36 se muestra un análisis representativo de CPA obtenidas al ZT5 de linfáticos aferentes; la presencia intracelular de Muc-2 fue detectada en CDi CD11c⁺ CD103⁺ y en una menor proporción en células CD11c⁻ CD103⁺ (Figura 36 A). En cuanto a la población de macrófagos CMH-II⁺F4/80⁺, encontramos la presencia de la glicoproteína en aquellas que resultaron también positivas para la expresión del receptor de fractalquina CX₃CR₁ (Figura 36 B).

4.5. Mayor capacidad de inducción de células CD4⁺Foxp3⁺ en la fase lumínica

La competencia funcional más relevante de las CDi CD103⁺ es la generación de células regulatorias. Estas CDi transportan antígenos luminales desde el intestino hacia los GLM donde estimulan células T CD4⁺ naïve y una fracción de éstas se diferencia a células regulatorias Foxp3⁺. Para evaluar la capacidad de las CPA de linfáticos aferentes de inducir la expresión de Foxp3 a distintos tiempos del día, se purificaron células CD4⁺ Foxp3⁻ a partir de GLM de ratones Foxp3-GFP mediante cell sorting y se cultivaron en proporciones iguales con células de vasos linfáticos obtenidas como se describió previamente. Luego de 48 hs de cultivo se analizó la inducción del marcador Foxp3 por citometría de flujo (Figura 37).

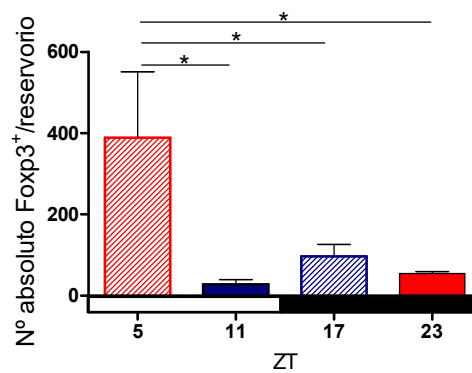


Figura 38. Capacidad de inducción de Foxp3 en células de linfáticos aferentes. Linfocitos CD4⁺ sorteados de GLM de ratones Foxp3-GFP se cocultivaron durante 48 hs con células de vasos linfáticos aferentes obtenidas a los ZT5, 11, 17 y 23. Mediante citometría de flujo se evaluó la inducción de Foxp3. Los datos se expresaron como medias \pm SEM de n=4-5/horario. * $p < 0,05$.

Observamos que las CPA de vasos aferentes obtenidas al ZT5 muestran una capacidad significativamente mayor de inducir la expresión del factor de transcripción Foxp3 luego del cultivo.

Nos preguntamos entonces si la ausencia de un gen del reloj podría estar afectando esta capacidad de la CPA (Figura 38). Para ello procedimos de manera similar a lo descrito para animales WT y por citometría de flujo se analizó en la población de células CD4⁺ la inducción de Foxp3 (Figura 39). En CPA deficientes en *Per2* la capacidad de inducir Foxp3 fue menor con respecto a células WT a todos los tiempos estudiados, alcanzando su menor efectividad al ZT11. Esto sugiere que la integridad molecular del reloj biológico contribuiría en la inducción de células regulatorias.

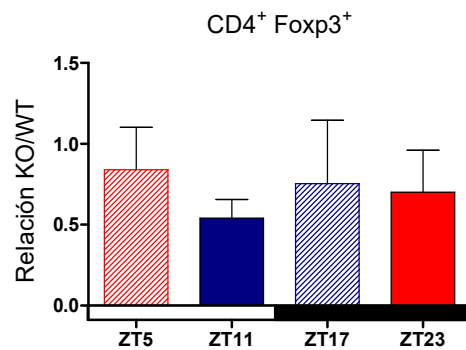


Figura 38. Capacidad de inducción de Foxp3 en células de linfáticos aferentes de ratones Per2KO. Linfocitos CD4⁺ sorteados de GLM de ratones Foxp3-GFP se cocultivaron durante 48 hs con células de vasos linfáticos aferentes obtenidas a los ZT 5, 11, 17 y 23. Mediante citometría de flujo se evaluó la inducción de Foxp3. Los resultados se expresaron como veces de cambio respecto de WT. Los datos son medias \pm SEM de n=4-5/horario.

4.6. Inducción de receptores homing sobre linfocitos CD4⁺

Experimentos previos en nuestro grupo de trabajo han demostrado el potencial de las CDi colectadas de los vasos linfáticos aferentes de inducir moléculas *homing* sobre linfocitos CD4⁺ (Novotny Nuñez y col., 2016). Dado que la adquisición de receptores *homing* es indispensable para la correcta localización de las distintas poblaciones efectoras, nos propusimos estudiar esta propiedad a lo largo del día. Para ello se purificaron mediante cell sorting células CD4⁺ que fueron cocultivadas en proporciones iguales con células de vasos linfáticos (obtenidas como se describió previamente) y por citometría se flujo se analizó la inducción de moléculas *homing* 48 hs postcultivo (Figura 39).

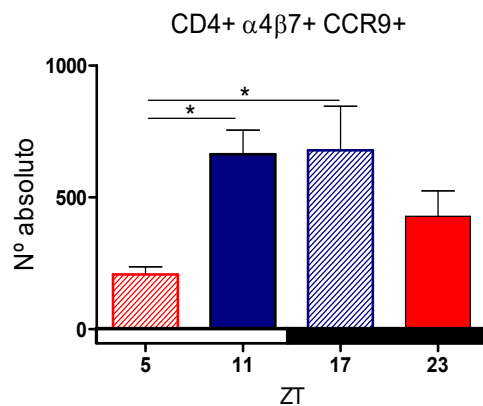


Figura 39. Capacidad de inducción de moléculas *homing* $\alpha_4\beta_7$ CCR9 a los ZT5, 11, 17 y 23. Linfocitos CD4⁺ sorteados de GLM se cocultivaron durante 48 hs con células de vasos linfáticos aferentes. Mediante citometría de flujo se evaluó la inducción de receptores *homing*. Los datos se expresaron como medias \pm SEM de n=4-5/horario. * $p < 0,05$.

La capacidad de inducir simultáneamente los receptores $\alpha_4\beta_7$ y CCR9 fue mayor a los ZT11 y 17. De manera interesante, el ZT5 parece un momento importante en la inducción de células regulatorias Foxp3⁺ mientras que la adquisición de moléculas *homing* necesarias para la re-entrada de células efectoras a la LP de intestino es más robusta a los ZT11 y 17.

Nuevamente se evaluó en ratones Per2KO la capacidad de las CPA de linfáticos aferentes de inducir moléculas *homing* y el factor de transcripción Foxp3 a lo largo del día.

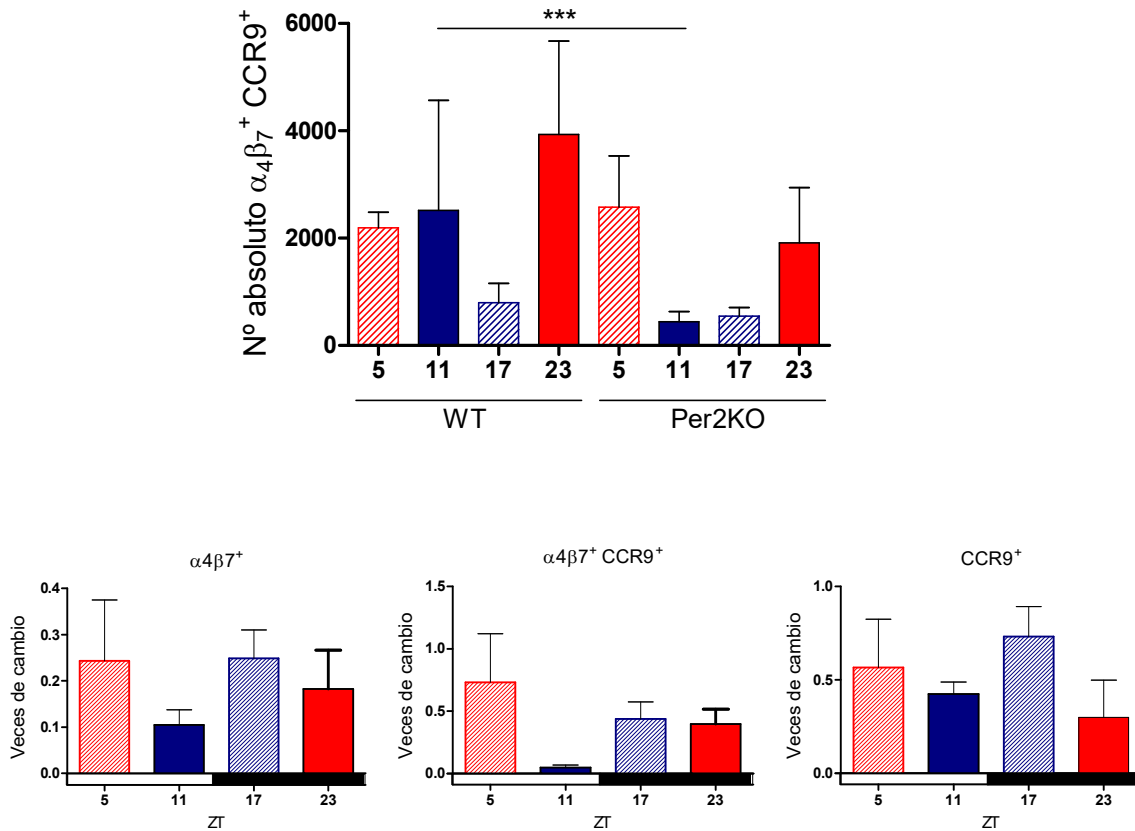


Figura 40. Habilidad de las CPAs de ratones Per2KO de inducir receptores *homing* y el factor de transcripción Foxp3. Células $\text{CD4}^+ \text{Foxp3}^-$ de ratones Foxp3-GFP fueron cocultivadas con células de vasos aferentes obtenidas de animales WT o Per2KO durante 48 hs. (A) Expresión de receptores *homing* en células CD4^+ totales. (B) Expresión de receptores *homing* en células $\text{CD4}^+ \text{Foxp3}^+$. Los resultados se muestran como el promedio de veces de cambio respecto al control \pm SEM de $n=2-4/\text{horario}$. *** $p < 0,001$.

Como se observa en la Figura 40, la capacidad de inducir receptores *homing* $\alpha_4\beta_7$ y CCR9 también estuvo disminuída especialmente al ZT11 en células CD4^+ observándose una tendencia similar en la población que expresa Foxp3⁺.

Esto confirma que la integridad molecular del reloj biológico es relevante para el reingreso de los linfocitos a LP y sugiere que en esta cepa el *homing* de poblaciones efectoras/regulatorias podría estar comprometido.

4.7. Los ritmos biológicos influyen en la tolerancia oral hacia antígenos proteicos

A pesar de que estudios recientes han comenzado a describir la influencia del reloj biológico en la inmunidad de mucosa, poco se conoce acerca de la contribución de los ritmos en la inducción y mantenimiento de la tolerancia hacia antígenos provenientes de la dieta. Por este motivo, nos propusimos investigar el efecto de los ritmos en la inducción de la tolerancia oral utilizando el modelo clásico de administración de ovoalbúmina (OVA).

Considerando los datos del análisis multivariado (Figura 15), los resultados de CPA y los tiempos óptimos de inducción de Foxp3, el antígeno fue administrado por vía oral a animales WT expuestos a condiciones estándares de luz-oscuridad al finalizar el período nocturno (ZT23) o el diurno (ZT11).

En los horarios indicados los animales recibieron 100 µg de OVA en PBS durante 5 días. Al día 10 se realizó la inmunización con OVA y adyuvante de Freund completo y al cabo de 8 días las células mononucleares de GLM se colorearon con carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE) y se estimularon in vitro para la evaluación de la proliferación por citometría de flujo (Figura 41).

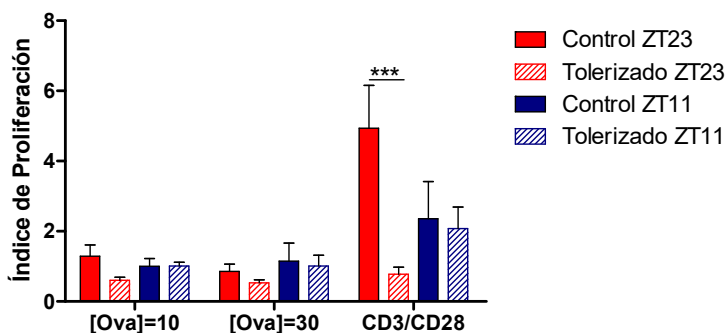


Figura 41. Proliferación de linfocitos CD4⁺ de animales controles y tolerizados. Se cultivaron células totales de GLM marcadas con CFSE durante 96 hs en presencia o ausencia del antígeno específico (10 o 30 ug de OVA/mL) o estimuladas con anti CD3/CD28. Se evaluó la proliferación de células CD4⁺ mediante dilución del CFSE usando citometría de flujo. Los datos se expresaron como índices de proliferación respecto de la proliferación basal para cada condición y horario ± SEM de n=5/hora. *** $p < 0,001$.

Observamos que cuando se administró el antígeno al ZT23 hubo una disminución en la proliferación antígeno específica (que no alcanzó significancia estadística); en tanto que en animales alimentados con OVA al ZT11 no encontramos diferencias respecto al control. Es interesante destacar que en el cultivo estimulado con anti-CD3/anti-CD28 hubo una significativa disminución en la proliferación de células provenientes de animales tolerizados al ZT23, posiblemente por efecto *bystander*.

En base a estos resultados quisimos establecer si las diferencias encontradas se debían a variaciones en la fase de la inducción de la tolerancia. Para ello se transfirieron células CD45.2⁺ CD4⁺ OT-II específicas para OVA a ratones WT CD45.1⁺; los receptores se trataron con OVA al 1,5% en el agua de beber comenzando al ZT11 o al 23 y durante 6 días; al séptimo día se evaluó en células CD45.2⁺ de GLM, de bazo y de LP la expresión de los factores de transcripción Foxp3 y Tbet *ex vivo* y la producción de citoquinas en GLM y bazo luego de la reestimulación con OVA *in vitro* por 24 hs.

Gánglio linfático mesentérico CD4⁺ CD45.2

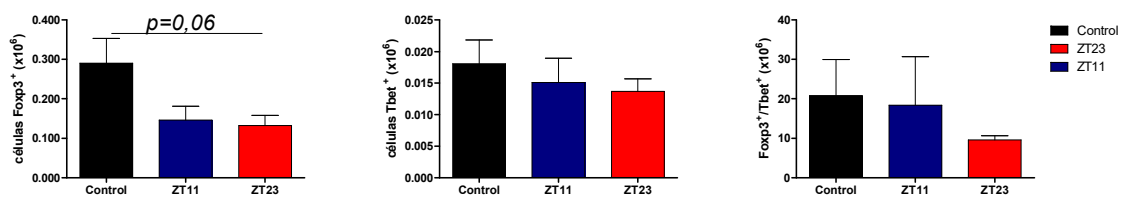
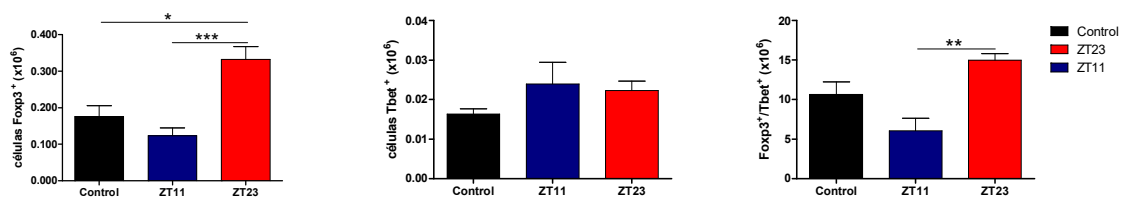


Lámina propia CD4⁺ CD45.2



Bazo CD4⁺ CD45.2

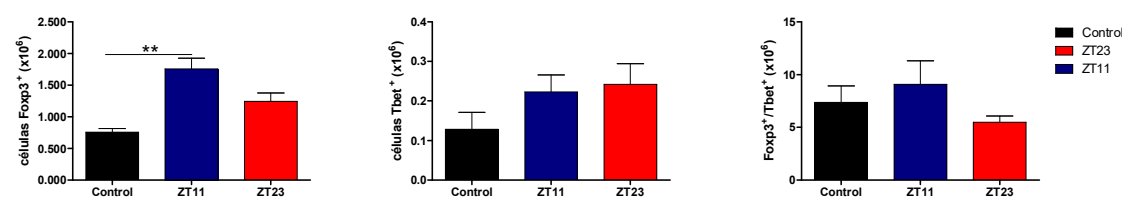


Figura 42. Inducción in vivo de factores de transcripción en células CD4⁺ OVA específicas. Frecuencia de células CD4⁺ CD45.2 OT-II Foxp3⁺ o Tbet⁺ específicas para OVA en GLM, LP y bazo de animales tratados o no (grupo control) con OVA al 1,5% en el agua de beber durante 6 días comenzando al ZT11 o 23. Los datos se expresaron como frecuencia de células positivas para Foxp3 o Tbet o la relación Foxp3/Tbet. Media ± SEM de n=4/hora. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

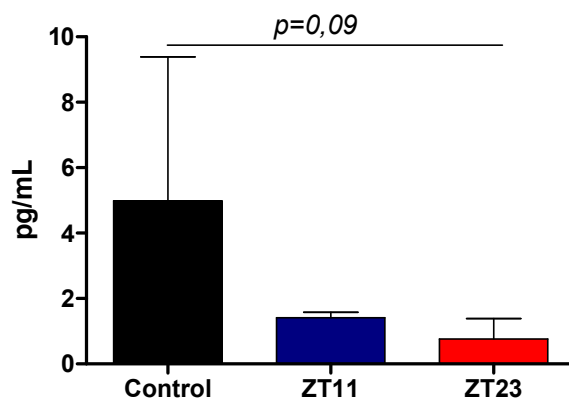


Figura 43. Producción de IL-10 en cultivos estimulados con anti-CD3/anti-CD28. Se evaluó la producción de IL-10 por ELISA en sobrenadante de células de GLM estimuladas 24 hs con anti-CD3/anti-CD28 de animales tratados o no (grupo control) con OVA al 1,5% en el agua de beber durante 6 días comenzando al ZT11 ó 23. Los datos se expresaron como pg/mL. Media ± SEM de n=4/hora.

Como se observa en la Figura 42, en GLM la administración oral del antígeno específico produjo una disminución en la frecuencia de células Foxp3⁺ a los dos ZT evaluados ($p=0,06$). De manera notable, cuando el antígeno se administró a partir del ZT23 las células OVA específicas Foxp3⁺ incrementaron significativamente en la LP, sitio efector por excelencia para antígenos incorporados por la vía oral. Cuando el antígeno se administró al ZT11 las células antígeno específicas Foxp3⁺ se localizaron preferentemente en bazo. Si bien no encontramos diferencias en la frecuencia de células Tbet⁺ específicas para el antígeno en ningún tejido estudiado la relación Foxp3/Tbet fue significativamente mayor en LP de ratones tolerizados al ZT23 lo que sugiere una tolerancia más eficiente en estos receptores. En la Figura 43 se representa la producción de IL-10 en células de GLM reestimuladas *in vitro* con antiCD3/anti-CD28 por 24 hs. Como se observa, la producción de IL-10 por células de los GLM de animales tratados con el antígeno fue menor ($p=0,09$) a los dos ZT estudiados,

lo que se correlaciona con la disminución de células F_{oxp3}⁺ en este tejido mostrada en la Figura 42.

Discusión

Discusión

El estudio de los ritmos biológicos ha adquirido una importancia fundamental para la comprensión tanto de eventos fisiológicos como de determinados desequilibrios que conducen a patologías. Los ritmos circadianos exhiben una periodicidad de aproximadamente 24 hs y se ajustan a diferentes condiciones geofísicas. Para que un ritmo biológico sea de naturaleza circadiana, debe oscilar en un entorno constante, independiente de factores externos como la luz o los alimentos, los dos *Zeitgebers* (ZT) más importantes. Este es el caso de los marcadores clásicos para los ritmos circadianos en mamíferos la temperatura corporal, la hidrocortisona plasmática o los niveles de melatonina. Por el contrario, los ritmos observados en condiciones no constantes de 12 hs luz/oscuridad se denominan ritmos diurnos (Druzd et al., 2014). En el presente trabajo de tesis hemos caracterizado la influencia de los ritmos biológicos en el funcionamiento de la inmunidad en la mucosa intestinal a lo largo del día. Mas específicamente, hemos descrito algunos mecanismos que gobiernan la localización temporal de distintas poblaciones leucocitarias en sitios inductivos de la respuesta inmune y su impacto en fenómenos claves de la homeostasis como la tolerancia hacia antígenos provenientes de la dieta.

En el primer bloque de resultados observamos que a lo largo del día fueron mayores los niveles de *Bmall* y hubo oscilaciones en los transcritos de *Per2* en GLM aunque no se encontraron diferencias significativas en las oscilaciones de estos dos genes que son claves en la maquinaria molecular del reloj circadiano. De acuerdo con nuestros resultados, utilizando un algoritmo específico para la determinación de ritmos (JTK_CYCLE, (Hughes, 2010 #129), se demostró que *Bmall* no sufre oscilaciones circadianas significativas en linfocitos B, macrófagos y CDs aislados de bazo (Adam C. Silver, Arjona, Hughes, Nitabach, & Fikrig, 2012). Además teniendo en cuenta que los GLM son un tejido inmunológico heterogéneo compuesto de tipos diferentes de células, algunas de las cuales fluctúan en números absolutos o relativos durante todo el día (Keller et al., 2009), las diferencias en los niveles de transcritos podrían estar compensándose, lo que añade complejidad al análisis de un tejido completo. Así y todo, la presencia de ambos genes en GLM corrobora lo encontrado por otros autores en tejidos asociados al intestino (Froy & Chapnik, 2007), y sugiere que el funcionamiento de un reloj biológico podría estar regulando procesos claves no sólo de la

fisiología intestinal sino también de la función inmune vinculada a la actividad específica del tejido. La importancia biológica de los resultados obtenidos en tejido linfoide de la mucosa intestinal, así como la contribución de cada tipo celular requerirá una cuidadosa investigación.

En este trabajo de tesis encontramos oscilaciones en la celularidad de sitios inductivos de la respuesta inmune como GLM, con aumentos significativos tanto durante la fase lumínica (ZT5) como la oscura (ZT17) que concuerdan con los ritmos descritos en la celularidad de varios tipos de ganglios linfáticos, indicando que estas oscilaciones constituyen un fenómeno relevante del compartimiento linfoide aunque órganos linfoides primarios como el timo o la médula ósea no exhibirían este comportamiento circadiano en su celularidad (Druzd et al., 2017). Al parecer, el dinamismo circadiano en la celularidad de los OLS sería un fenómeno amplio y robusto, no restringido a sitios específicos del organismo y dependiente tanto de factores ambientales como de la expresión específica de moléculas sobre la superficie de las células (Silva-Sanchez & Randall) (Druzd et al., 2017). El número absoluto de linfocitos $CD4^+ CD62L^+$ se vió incrementado a los ZT5 y 11 principalmente, mientras que los linfocitos $CD8^+$ se mantuvieron constantes a lo largo del día. Estas oscilaciones podrían estar relacionadas con cambios en los niveles de CCL21 en GLM así como con una expresión diferencial de CD69. En efecto, el ingreso y egreso hacia y desde nódulos linfáticos está regulado por (i) la acción de factores con función antagónica como la quimioquina CCL21, producida por células del estroma de ganglios linfáticos y esfingosina-1-fosfato (S_1P), producida por el endotelio de vasos sanguíneos y linfáticos y glóbulos rojos; (ii) la oscilación en la expresión de sus receptores CCR7 y S_1PR_1 , respectivamente (Druzd et al., 2017) y (iii) otras moléculas como CD69. Las concentraciones de S_1P elevadas en sangre y linfa y bajas en tejidos, generan un gradiente que guía el egreso de linfocitos hacia los linfáticos eferentes (Cyster, 2012 #262). El marcador de activación temprana CD69 se asocia físicamente al S_1PR_1 y el complejo de proteínas sufre internalización desde la superficie celular, evitando el egreso (Shiow et al., 2006). En nuestro sistema experimental, a pesar del aumento en el recuento de células, la expresión de CD69 fue mínima al ZT5 en ambas poblaciones de linfocitos T y esta reducción explicaría la disminución observada posteriormente al ZT11, ya que más células podrán empezar a abandonar el GLM. A su vez, el aumento en los niveles de CCL21 al ZT11, explicaría el incremento en la celularidad observado al tiempo al ZT17.

En cuanto al posible significado de estas oscilaciones, se ha descrito que las células T CD4⁺ que responden a los complejos péptido-CMH endógenos aumentan de forma transitoria el CD69, y experimentan un retraso en su salida en comparación con otras células T, lo que tiene una influencia basal sobre la recirculación de linfocitos (Tomura, Itoh, & Kanagawa, 2010). Es decir, las células T que han tenido una estimulación a través del TCR transitoria o débil, pero suficiente para aumentar CD69, podrían ser retenidas en ganglios para favorecer otros encuentros con CDi lo que produciría la activación completa o la inducción de tolerancia (Cyster, 2012 #262), un fenómeno que ocurre continuamente en la mucosa intestinal.

También observamos que el número absoluto de CPA CMH-II⁺ no fue constante a lo largo del día, sino que se produjo un aumento significativo hacia el comienzo de la fase oscura (ZT11), en donde se registra mayor actividad de los animales. El hecho de que el ingreso a GLM de linfocitos y CPA esté sincronizado en un determinado tiempo del día sugiere que habría momentos en los que la probabilidad de que se induzca una respuesta inmune antígeno específica en la mucosa intestinal sería mayor. Esta ventana temporal coincidiría con la masiva entrada de antígenos, durante el período de actividad e ingesta de los animales. Además, como ciertos nutrientes y los tiempos en los que se produce la ingesta pueden sincronizar relojes periféricos (Froy & Chapnik, 2007), resulta sumamente relevante definir las ventanas temporales en las que ocurrirían eventos críticos para la fisiología de ciertos tejidos para poder avanzar luego en la caracterización molecular. En este sentido se sabe que si bien los ritmos en los tejidos podrían estar sincronizados globalmente, a nivel local y a través de los nervios simpáticos se estimularían oscilaciones específicas en la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas por las células endoteliales (Scheiermann et al., 2012). Estos ritmos estarían acompañados por oscilaciones endógenas en la expresión de factores pro-migratorios por las células inmunes (por ejemplo receptores), aumentando así la probabilidad de su *homing* en etapas particulares del día (Scheiermann et al., 2013). Los estudios multivariados realizados en el presente trabajo apuntan a que el ZT5 sería esta ventana temporal en la cual estarían dadas las condiciones más favorables para el desarrollo de respuestas tolerogénicas hacia antígenos orales.

A diferencia del estudio de oscilaciones circadianas en el tráfico celular desde y hacia los ganglios linfáticos, la capacidad que las distintas subpoblaciones de células efectoras adquieren dentro de los OLS de reingresar a determinados sitios efectores ha sido poco estudiada. En este trabajo encontramos diferencias significativas en la expresión de receptores *homing* $\alpha_4\beta_7$ y CCR9 sobre las distintas poblaciones de GLM, lo que demostraría que además del reclutamiento a sitios inductivos, el reingreso a sitios efectores también estaría regulado temporalmente. Este novedoso hallazgo no ha sido reportado y este trabajo de tesis es el primero en indagar si la adquisición de la capacidad de *homing* hacia LP sigue algún ritmo biológico. En nuestro modelo, las condiciones para el reingreso de LT $CD4^+$ y $CD8^+$ a LP serían más favorables tanto durante el período lumínico como de oscuridad (ZT5 y ZT17). Los linfocitos B en cambio, no presentaron una oscilación clara. Los mecanismos moleculares que controlan la expresión de receptores de *homing* en las células B no están claros, pero se ha demostrado que cuando las células B murinas se activan por ligandos de TLRs, cambian su comportamiento de migración (Morrison, Barr, Brown, & Gray, 2010). Recientemente, se ha demostrado un rol crítico de la lectina CD22 expresado principalmente por linfocitos B *naïve* y de memoria en el *homing* de linfocitos B en PP (Habtezion et al., 2016). Además, en contraste con las células T $CD4^+$ *naïve*, que tienen sólo niveles moderados de $\alpha_4\beta_7$, las células B *naïve* expresan altos niveles de $\alpha_4\beta_7$, casi comparables con los de las células B y T de memoria. Estas diferencias podrían contribuir a la preferencia relativa observada en la distribución de células B *naïve* a PP y células T *naïve* a GLM (Rott, Briskin, & Butcher, 2000), lo que explicaría que la expresión de estas moléculas *homing* encontrada en linfocitos B de GLM sea más estable.

En cuanto a las citoquinas, en PP se observó un aumento significativo en la producción de $IFN\gamma$ al ZT17, momento de mayor actividad de los animales; mientras que IL-10 se vio aumentada al ZT23. Esta cinética en la producción de ambas citoquinas podría ser estimulada por una mayor llegada de antígenos durante la ingesta que tiene lugar principalmente durante la fase oscura. Se encontró que la biogeografía y el metaboloma de la microbiota intestinal, que sustancialmente influyen en la fisiología del huésped, experimentan oscilaciones diurnas (C. A. Thaiss et al., 2016). Estos autores muestran que el número de bacterias que se adhieren al epitelio es 10 veces mayor durante la fase oscura respecto a la luminica, y esta proximidad influye significativamente en el transcriptoma del huésped. La producción de mediadores

inflamatorios generaría una liberación de mediadores anti-inflamatorios que regulan estas señales volviendo el sistema a un estado basal en la fase lumínica. En efecto, la producción de IL-10 específica por células Th1 sería una etapa normal en su programa de diferenciación, que se alcanza después de la activación completa, para inhibir la respuesta inflamatoria (O'Garra & Vieira, 2007). Numerosos hallazgos respaldan el concepto general de que la producción de IL-10 es un factor importante de autorregulación (Jankovic, 2010 #260) y permitirían explicar que con sólo 6 hs de diferencia, en nuestro sistema experimental se detecten citoquinas con perfiles antagónicos.

Por otro lado, en GLM se observó un aumento de IL-10 e IL-4 durante el período diurno (ZT5 y 11), al igual que de IL-22, citoquina esencial en los procesos de reparación tisular en intestino; en tanto que citoquinas pro-inflamatorias como IFN γ e IL-17 no mostraron un perfil contundente. Que las citoquinas anti-inflamatorias se encuentren aumentadas a posterior del período de ingesta resulta interesante ya que sugiere que éste sería el período donde estarían dadas las condiciones más propicias para el desarrollo de la tolerancia hacia antígenos provenientes de la dieta.

En este trabajo utilizamos ratones de la cepa Per2ko homocigotas, ya que (i) los ratones mutantes Per2KO heterocigotas no muestran ningún defecto fenotípico en la fisiología circadiana y (ii) permiten establecer una relación causal entre el defecto en la maquinaria del reloj y los parámetros estudiados de la inmunidad intestinal. Nuestros resultados mostraron que *Per2* influye en el comportamiento oscilatorio de la celularidad en GLM ya que la deficiencia en este gen causó un mayor predominio de células hacia el comienzo de la fase nocturna comparado con animales WT. Además, las oscilaciones encontradas en el recuento de linfocitos T y B en GLM a lo largo del día requerirían de la integridad de la maquinaria molecular del reloj circadiano lo que concuerda con lo reportado por otros autores. Así por ejemplo, el uso de animales deficientes en *Bmal1* resultó en diversos fenotipos (Bunger et al., 2000) con alteraciones principalmente en el número de linfocitos B (Sun et al., 2006). Más recientemente se ha demostrado que la ausencia específica de *Bmal1* en células T CD4⁺, CD8⁺ y B eliminó el comportamiento oscilatorio en estas poblaciones y mejoró los signos clínicos en un modelo de encefalomiелitis autoimune. Más aún, el recuento de linfocitos CD4⁺ o CD8⁺ se vio negativamente afectado ya que los números disminuyeron

significativamente (Druzd et al., 2017). En cuanto a mediadores solubles, la ausencia de *Per2* provocó el aumento significativo en citoquinas características de un perfil Th2 como IL-4 en la fase oscura y un incremento de mediadores inflamatorios como IL-17 durante la etapa diurna. Otras citoquinas como IL-23 e IFN γ estuvieron mejor representadas durante el período nocturno. Se ha descrito la regulación circadiana para muchos marcadores inmunes en intestino, incluyendo IL-2, IL-10, GM-CSF, CCR2, IL-6, IL-1 β , TNF- α y algunos receptores (Oscar Castanon-Cervantes et al., 2010) por lo que la manipulación genética del reloj circadiano podría modular la producción de estos factores. Por ejemplo, la ausencia de *Per2* se relacionó con la pérdida en la producción oscilatoria de la citoquina pro-inflamatoria IFN γ (Arjona & Sarkar, 2006a), y tuvo un rol protector en un modelo de sepsis inducida con LPS (Liu et al., 2006). Es decir, la integridad del reloj circadiano sería un elemento clave en la función biológica de las distintas poblaciones de células inmunes tanto adaptativas como innatas, así como en el tenor de la respuesta inflamatoria inducida por antígenos. Dado que los transcritos de *Bmal1* y *Per2* oscilan en fases opuestas (Druzd et al., 2017), *Per2* podría funcionar como regulador positivo para citoquinas pro-inflamatorias en determinados momentos del ciclo mientras que *Bmal1* funcionaría como una molécula anti-inflamatoria principalmente para células innatas.

Distintos estudios biomédicos han demostrado que la interrupción de los ritmos circadianos tiene importantes consecuencias en la salud humana, como la aparición de desórdenes metabólicos (McFadden, Jones, Schoemaker, Ashworth, & Swerdlow, 2014) (Moller-Levet et al., 2013), cáncer (Dauchy et al., 2014) y disfunciones inmunes (Cuesta, Boudreau, Dubeau-Laramee, Cermakian, & Boivin, 2016), incluso exacerbando los síntomas en determinadas patologías (Damasceno et al., 2015). En animales de experimentación, las alteraciones en las condiciones lumínicas están también asociadas con cambios en el comportamiento (Marco, Velarde, Llorente, & Laviola, 2016), metabolismo (Fonken et al., 2010; K. Xu, DiAngelo, Hughes, Hogensch, & Sehgal, 2011) (H. Xu et al., 2014), reproducción e inmunidad (Kandis L. Adams, Oscar Castanon-Cervantes, Jennifer A. Evans, & Alec J. Davidson, 2013; Bedrosian, Fonken, Walton, & Nelson, 2011; Kiessling et al., 2017) (Guerrero-Vargas et al., 2015) (Phillips, Savenkova, & Karatsoreos, 2015); inclusive con alteraciones en la composición de la microbiota del huésped (R. M. Voigt et al., 2016).

Poco se sabe acerca de los mecanismos que subyacen a estos eventos. En este trabajo, en animales expuestos a regímenes de LD 12:12 se observaron cambios a lo largo del día en la estructura del tejido intestinal que serían parte de la fisiología normal del tracto. El reloj circadiano es jerárquico y el núcleo supraquiasmático del hipotálamo recibe la entrada de luz de la retina para sincronizarla con el ciclo diario de LD. Incluso en ausencia de luz, este núcleo genera ritmos en la temperatura corporal, ingesta de alimentos y niveles hormonales que sincronizan los relojes de otros tejidos, como el intestino (Scheving, 2000 #263). En qué medida el reloj intrínseco en el intestino regula el recambio tisular ha sido poco estudiado. Nuestros resultados son novedosos ya que reportan cambios en la estructura de las distintas tunicas que conforman las paredes del intestino en condiciones fisiológicas. Los cambios circadianos en la función celular evidenciados por estudios bioquímicos o moleculares se correlacionan con cambios descritos en algunas porciones del TGI de roedores; además el epitelio y las subestructuras de células son entidades dinámicas cuyas densidades volumétricas subcelulares, citoplasmáticas, patrones de distribución y contenidos histoquímicos cambian de manera circadiana (Scheving, 2000). En condiciones disruptivas provocadas por variaciones en las condiciones de luz y oscuridad se indujeron significativos cambios en las poblaciones de células inmunes con una disminución en el recuento total tanto en PP como en GLM. Paradójicamente, las poblaciones de linfocitos B y CD4⁺ se encontraron significativamente aumentadas durante la fase nocturna en condiciones de oscuridad continua, mientras que en luz continua, todas las poblaciones linfocitarias aumentaron significativamente durante el período de oscuridad. En cuanto a la histoarquitectura del intestino, se evidenciaron otro tipo de alteraciones principalmente bajo condiciones constantes de luz, con degeneración de enterocitos que comprometieron incluso la integridad de la barrera epitelial. Muy recientemente se ha demostrado que la regeneración del epitelio intestinal en ratones es dependiente de *Bmal1*; las citoquinas, que se expresan rítmicamente en el intestino durante la regeneración, estimulan una respuesta circadiana de estrés en los enterocitos que promueve la proliferación/diferenciación rítmica del epitelio cada 24 hs (Stroke y col., 2017). Otros autores (Grootjans et al., 2011) han descrito fenómenos similares en modelos de isquemia-reperfusión en donde habría un acortamiento de las microvellosidades producto de la contracción de la LP que involucraría a la quinasa de miosina MLCK. En este modelo, la contracción de la LP produciría a un desprendimiento de

los enterocitos de la membrana basal subyacente llevando a un proceso de muerte conocido como anoikis (apoptosis dependiente de caspasa inducida por desprendimiento de la membrana basal). Las células normales están dotadas de un sistema de vigilancia que es responsable de mantenerlas en la posición correcta dentro de sus respectivos tejidos, y de esta manera cualquier célula que se desvíe de su posición asignada y pierda el anclaje mediado por integrinas sufre anoikis (Beauséjour et al., 2013). Esta contracción exacerbada evidenciada en condiciones lumínicas disruptivas en nuestro trabajo podría representar un mecanismo rápido que restaura la integridad de la barrera epitelial atenuando o impidiendo el desarrollo de una respuesta inflamatoria local (Matthijsen et al., 2009). En este sentido, como parte del proceso dinámico de la renovación del epitelio intestinal, las células obsoletas entran normalmente en anoikis al alcanzar el ápice de las vellosidades y sufren exfoliación como medio de renovación continua (Edelblum, Yan, Yamaoka, & Polk, 2006).

En intestino grueso no se observaron cambios en la arquitectura con la disrupción del ciclo 12:12 pero si se detectaron modificaciones en la producción de mediadores pro-inflamatorios como el ON, con diferencias marcadas en el patrón de expresión y una franca disminución de aproximadamente 10 veces comparados con el control LD 12:12. Se sabe que el ON desempeña un papel paradójico en la fisiología intestinal. Es producido en el intestino principalmente por dos ON sintasas, la endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS). La eNOS se expresa constitutivamente en los microcapilares intestinales con una producción en muy bajos niveles que regula el tono vascular y el flujo sanguíneo de la mucosa, participando del mantenimiento de los capilares mucosos y la homeostasis. La iNOS aumenta durante la inflamación y es responsable de altos niveles de ON, que aumentan dramáticamente el flujo sanguíneo dilatando los capilares (Grishin, Bowling, Bell, Wang, & Ford, 2016). No obstante, aunque el ON puede contribuir a la citopatología, algunos autores han propuesto que este mediador podría actuar como un scavenger secuestrando productos oxidantes y atenuando la injuria. El ON reacciona con el superóxido rápidamente generando peroxinitrito y por la capacidad de difusión del ON, el superóxido y el ON no necesitan ser producidos en la misma célula para formar cantidades significativas de peroxinitrito (Chokshi et al., 2008). En condiciones agudas el ON contribuiría a la reparación de la barrera en tanto que una reducción en sus niveles podría exacerbar la injuria (Singer et al., 1996). En

esta misma línea, y empleando variadas metodologías, se ha demostrado la expresión constitutiva de la iNOS en íleon de ratón (Hoffman et al., 1997) y en epitelio de colon humano no inflamado (Roberts et al., 2001). En base a estos datos se ha hipotetizado que el ON derivado de células epiteliales podría proporcionar una barrera oxidativa, reduciendo así la translocación bacteriana a través de la mucosa colónica. Este mediador, en un tejido expuesto a una gran densidad de microorganismos como el colon, podría considerarse integrante de la barrera colónica local. La disminución franca en sus niveles en nuestros modelos de disrupción lumínica podría explicar la degeneración mitocondrial del epitelio ya que el superóxido puede dañar directamente el ADN mitocondrial, las proteínas y los lípidos (Mao et al., 2014).

En cuanto a las mucinas, la perturbación en los ciclos 12:12 LD se asoció a una mayor prevalencia de las del tipo neutras en colon. Las células epiteliales producen mucinas, neutras ricas en glucógeno y mucinas ácidas, que pueden ser, sulfomucinas según el predominio de radicales sulfato o sialomucinas, ricas en ácido siálico. En la mucosa colónica normal la proporción de mucinas ácidas a neutras permanece constante pero puede ser modificada en enfermedades inflamatorias intestinales y generalmente la inversión de estas proporciones se considera un hallazgo patológico (Nonose et al., 2009). Estudios utilizando un modelo experimental de colitis por desviación- en el que se impide el tránsito fecal en una porción del colon por varias semanas- han mostrado que la etiopatogenia de la inflamación está probablemente relacionada con la deficiencia intraluminal de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) derivados de la actividad fermentativa de la microbiota, que son el principal sustrato energético para las células epiteliales del colon (Glutzer, Glick, & Goldman). En la mucosa colónica sin flujo fecal, el proceso inflamatorio provocado por la falta de SCFAs y los cambios en el metabolismo energético aumentan las especies reactivas de oxígeno que dañan la capa de moco y reducen el nivel de mucinas ácidas totales, principalmente a expensas de las sialomucinas (Bonassa, 2015 #289). Mediante distintas técnicas bioquímicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas se han demostrado que, en las diferentes formas de colitis, se producen anomalías en el patrón de expresión de las mucinas a lo largo de las criptas de la mucosa del colon y estos hallazgos han hecho atractiva la hipótesis de que la etiopatogenia de la colitis ulcerosa podría estar relacionada con cambios en la producción de

mucina en individuos con factores predisponentes, o a cambios causados por factores intraluminales (Martinez et al., 2010). En esta tesis no hemos explorado ninguna de estas alternativas; sin embargo teniendo en cuenta los efectos asociados a las perturbaciones lumínicas, nos surgen atractivos interrogantes para futuros estudios tendientes a establecer si alguno de los mecanismos descritos podría ser el causante de la inversión observada en nuestros ratones. Más aún, sería relevante determinar si las perturbaciones del ritmo representarían el disparador de fenómenos inflamatorios luminales que impactan sobre un elemento central de la barrera colónica como es la mucina.

También observamos que distintas poblaciones de CPA oscilaron a lo largo del día en GLM, lo que evidencia que no sólo la llegada de linfocitos sino también de poblaciones que transportan antígenos dietarios y microbianos desde el lumen están sujetas a ritmos biológicos (Nguyen, #224; Worbs, 2006 #264). Células CMH II⁺ CD11c⁺ CD11b^{low} migratorias predominaron durante el período nocturno respecto a las CD11b^{high} que fueron más constantes a lo largo del día. En un trabajo seminal para la biología de las CD, se extirparon los GLM y por canulación del conducto torácico se colectó la linfa que drena la LP para estudiar las CD migrantes (Milling, 2010 #265). Este estudio permitió establecer que hasta un 90% de las células presentes en la linfa aferente expresan las moléculas CD11c y CD11b y que CD103 es un marcador característico de células migratorias; una proporción menor corresponde a células CD11c⁻CD11b⁺ con características de células fagocíticas, que mayoritariamente expresan el marcador de fractalquina (CX₃CR₁). La expresión de este receptor es una impronta del anclaje previo de esas células al epitelio (productor de fractalquina) durante la captación de antígenos del lumen (Nguyen, #224; Bogunovic, 2009 #266). Otros autores han aportado evidencia experimental de que las células CX₃CR₁ de la LP son las que mayoritariamente captan los antígenos luminales a través de proyecciones al lumen y luego los transfiere por canales generados por fusión de membranas a las CDi CD103⁺ (Mazzini, 2014 #267). En términos generales, los autores de estos trabajos sugieren que diariamente unas 800000 CDi migran desde la LP a los GLM (Milling, 2010 #265), aunque no se ha podido establecer exactamente cuáles son las señales que gobiernan esta migración. Nuestros resultados muestran que las CPA no se dirigen a los sitios inductivos de manera continua sino que tienen patrones oscilatorios orquestados por señales como CCL21;

la pérdida de estos patrones (al menos parcialmente) en ratones en los que un gen del reloj es deficiente sugiere que esta maquinaria molecular coordina el tráfico leucocitario hacia sitios inductivos a distintos niveles (Scheiermann, 2012 #137).

Un hallazgo relevante fue la presencia de Muc-2 tanto en CDi CD103+ migratorias como en células macrofágicas F4/80+ CX3CR1+ de vasos aferentes. De acuerdo con nuestros resultados, se ha demostrado que las CDi pueden estar expuestas a Muc-2 por captación directa, a través de interacciones con las células goblet o a través de vesículas que contienen Muc-2 liberadas por células epiteliales (Shan, 2013 #81). La presencia de Muc-2 mejora las funciones tolerogénicas de CDi, incluyendo la producción de TGF β , IL-10 o AR, factores que inducen la producción de células T regulatorias. En nuestro sistema, las CPA de linfa aferente mostraron una máxima capacidad de inducción del factor Foxp3+ al ZT5, que estuvo significativamente reducida en ausencia del gen Per2. La mayor prevalencia de células Foxp3+ en intestino se asocia a la continua estimulación con antígenos foráneos en este ambiente y explica que muchas células T regulatorias tengan TCR con especificidad por antígenos de la microbiota (Lathrop, 2011 #268). La regulación de la potencialmente peligrosa mezcla de antígenos a la que se expone el sistema inmune intestinal recae en sofisticados mecanismos, entre los que las células regulatorias tienen un papel protagónico. Es de esperar entonces, que esta actividad esté afectada por los relojes periféricos locales. En este sentido, se ha reportado recientemente que el porcentaje y el número de células T regulatorias Foxp3+ disminuyó notablemente en la piel inflamada y los ganglios linfáticos drenantes de ratones sometidos a luz continua (LL) comparados con ratones LD. La mutación de un gen circadiano clave, Bmal1, también exacerbó las respuestas de inflamación de la oreja y la infiltración celular en la piel de ratones (Mizutani, 2017 #269). Además, la ablación específica del gen Bmal1 en células de origen mielóide resulta en un perfil pro-inflamatorio (K. D. Nguyen et al., 2013), mientras que la ablación de este gen en células de la inmunidad adaptativa no provoca un fenotipo claro (Druzd et al., 2017). Posiblemente, genes pertenecientes al reloj circadiano podrían estar afectando la diferenciación hacia determinados perfiles inmunológicos. Las células T CD4 + productoras de interleucina-17 (Th17) constituyen una población efectora proinflamatoria importante en la protección de las superficies de la mucosa contra infecciones bacterianas y fúngicas. Las especificaciones de los complejos programas génicos necesarios para su diferenciación son reguladas por el

factor de transcripción ROR γ t. Yu y col han mostrado que la actividad de ROR γ t estaría regulada de manera circadiana, afectando así la diferenciación hacia el perfil Th17. Es decir, la diferenciación hacia un linaje específico en células del sistema inmune estaría bajo control circadiano directo (Yu, 2013 #287). En el caso de las células T regulatorias, los perfiles de expresión del genoma están parcialmente bajo el control de Foxp3 e incluye moléculas de superficie celular, componentes de señalización y factores de transcripción expresados diferencialmente en estas células en comparación con su expresión en células T convencionales (Feuerer, 2009 #270). Nosotros encontramos que la ausencia específica del gen *Per2* no sólo influyó en el reclutamiento a ganglio sino que redujo la competencia de CPA de inducir células T regulatorias Foxp3⁺ en este OLS. Este efecto es notable si se tiene en cuenta que las CDi CD103⁺ una vez que llegan a los GLM a través de la linfa aferente, cooperan con el estroma para configurar un ambiente único que condicionará las características de la respuesta de los linfocitos T que se activen en este escenario (Molenaar, 2009 #288). Observamos también que la ausencia de uno de los genes del reloj alteraría una propiedad funcional distintiva de las CPA como es la capacidad de imprimir tropismo a las células efectoras para reingresar a sitios efectores. Nuestro trabajo es el primero en reportar que la capacidad de CPA de inducir moléculas *homing* $\alpha_4\beta_7$ y CCR9 se ajusta a un ritmo biológico. Este hallazgo es relevante ya que se considera que la integrina $\alpha_4\beta_7$ es esencial para regular los fenómenos inflamatorios intestinales porque media la relocalización de las células regulatorias en la LP evitando la activación aberrante de la inmunidad innata (Zhang, 2016 #273). Más aún, se ha demostrado que esta molécula es clave en la recirculación de células regulatorias a la mucosa durante la inflamación (Fischer, 2016 #274). La inducción de los receptores de *homing* ocurre por acción del AR producido principalmente por las CDi (Coombes, 2007 #275) aunque también puede ser aportado por el estroma del GLM (Hammerschmidt, 2008 #276). El mecanismo por el cual el AR induce $\alpha_4\beta_7$ y CCR9 en células T está mediado, al menos en parte, por un efecto directo del complejo AR y el receptor RAR α , también integrante el reloj molecular (Crumbley, 2010 #278; Teboul, 2008 #279; Pathak, 2013 #280; Gooley, 2016 #281; Cook, 2015 #282;) sobre los promotores de genes *Itga4* (que codifica la cadena de integrina α_4) y *Ccr9* (Ohoka, 2011 #277). La expresión estas dos moléculas ocurre luego de la activación discreta del TCR que vuelve a la célula más sensible al AR; además, primero se expresa la integrina $\alpha_4\beta_7$ en tanto que CCR9 requiere una

estimulación más prolongada. Estos umbrales permitirían que las células puedan adquirir los receptores de *homing* con bajos suministros de antígenos y en presencia de AR, dos condiciones características para la inducción de la tolerancia. Esta cascada de eventos explicaría además por qué la máxima inducción de los receptores de *homing* y la expresión de Foxp3 ocurre a distintos ZT.

La respuesta de sistema inmune cuando es desafiado con antígenos específicos a lo largo del día, se ajusta a las oscilaciones descritas en los distintos factores involucrados (Adam C. Silver, Arjona, Walker, & Fikrig) (Fortier et al., 2011; Gibbs et al., 2014; K. D. Nguyen et al., 2013) (Druzd et al., 2017). Además, las oscilaciones en el número de células CD4⁺ en OLS durante el inicio del encuentro con el antígeno parece tener un papel importante en la severidad en distintos modelos de enfermedades inflamatorias (Druzd et al., 2017) o de alergia hacia antígenos alimentarios (Tanabe et al., 2015). En nuestro sistema encontramos un aumento en el número absoluto de células T regulatorias CD4⁺ Foxp3⁺, claves en la inducción, desarrollo y mantenimiento de tolerancia durante la fase lumínica en GLM. Esto coincidió con lo observado en el estado de activación linfocitaria, que fue menor. Al igual que las respuestas innatas que están bajo control circadiano (Gibbs et al., 2014, Keller y col., 2009; Nguyen et al., 2013; Scheiermann et al., 2012), también las respuestas inmunes adaptativas parecen estar reguladas de manera circadiana. Nuestros datos del análisis multivariado muestran que las condiciones que determinarán la generación y tipo de respuesta inmune adaptativa son distintas en las fases lumínicas y nocturnas, y más específicamente al ZT11. Las diferencias encontradas en la respuesta inmune adaptativa después de la inmunización con OVA confirmaron que el período diurno favorece respuestas del tipo tolerogénicas hacia antígenos provenientes de la dieta, en comparación con los períodos nocturnos. En modelos murinos de alergia a antígenos dietarios utilizando OVA, Tanabe y col. demostraron que la administración oral del antígeno durante el periodo lumínico indujo mayor severidad en los síntomas de la alergia comparado con la administración durante el período nocturno (Tanabe, 2015 #127). Esta severidad estuvo acompañada de una mayor producción de citoquinas del perfil Th2 (IL-13 e IL-5), mayor diarrea y pérdida de peso. De manera interesante, la absorción del antígeno OVA resultó significativamente aumentada durante la fase lumínica debida al aumento en la permeabilidad

intestinal dada por la disminución en la expresión de proteínas presentes en las uniones estrechas en el epitelio. En nuestro trabajo, en el modelo de tolerancia a OVA encontramos menores índices de proliferación en células de GLM cuando la ingesta del antígeno ocurrió durante la fase oscura tardía (ZT23) y no cuando el antígeno se administró en la fase lumínica tardía (ZT11). Más aún, en ensayos de transferencia adoptiva de células CD4⁺ OT-II⁺ OVA específicas, la administración diaria del antígeno empezando al ZT11 o ZT23 resultó en la inducción de células T Foxp3⁺ ; de manera interesante estas células estuvieron muy poco representadas en GLM observándose que, cuando el antígeno se administró al ZT23 las células Foxp3⁺ se localizaron en la LP, en tanto que cuando el antígeno se administró desde el ZT11, las células Foxp3⁺ se concentraron en bazo. De acuerdo con nuestros datos, hay evidencias que muestran que la tolerancia oral además de sus efectos sistémicos, actúa localmente en el intestino previniendo los fenómenos inflamatorios crónicos que resultan de la excesiva reactividad contra antígenos dietarios (Hadis, 2011 #283). El egreso de las células de ganglio explicaría la reducida producción de IL-10 en este tejido. Esto remarca nuevamente el concepto de que el momento exacto de la administración del antígeno y su posterior encuentro con células específicas es decisivo para el desarrollo de respuestas tolerogénicas que inducen células regulatorias Foxp3 capaces de condicionar la tolerancia a nivel periférico. En este sentido Pabst y col., han propuesto un modelo de generación de células regulatorias en etapas: la primera supone la activación de células *naïve* antígeno específicas en los GLM para generar un núcleo fundador que va a colonizar la LP intestinal (es la tolerancia latente); en la segunda fase ocurre el *homing* de estas células y la instalación "irreversible" de la tolerancia en los tejidos expuestos al antígeno. Aquí, por efectos de señales de células residentes, se produce la expansión de estas células, y en la tercera etapa ocurre la diseminación a nivel sistémico (Hadis, 2011 #283). Existe bastante consenso en cuanto a que en el intestino las células T regulatorias Foxp3⁺ se localizan primariamente en la LP (Colonna, 2016 #284; Sujino, 2016 #285). De manera interesante, paulatinamente se produciría una migración unidireccional desde LP al epitelio, en donde la estimulación con antígenos lumbinales fuerza la plasticidad de estos linfocitos que se convierten en células CD4⁺ intraepiteliales que dejan de expresar el marcador característico Foxp3 (Sujino, 2016 #285).

En términos generales, se ha propuesto que el sistema inmune oscila entre dos fases a lo largo del día, una representada por un estado de alerta intensa cuando el animal se prepara para la transición a la actividad y el riesgo de infección o lesión es mayor, y un segundo estado cuando el animal descansa y el riesgo de infección y lesión se reduce. Este estado puede proporcionar una oportunidad para la resolución de la inflamación y la reparación de los tejidos (Curtis, 2014 #3). Nuestro trabajo de tesis avanza en esta conceptualización demostrando la significativa influencia de la maquinaria del reloj circadiano en el funcionamiento del sistema inmune en el intestino y de las connotaciones fisiológicas de la misma. Nuestros resultados nos permitieron caracterizar una ventana temporal al final de la etapa de mayor actividad de los animales en la que distintos factores y poblaciones leucocitarias convergen en los GLM para desplegar en su mayor potencial la maquinaria de la tolerancia. Pudimos demostrar además cómo la ausencia de un gen del reloj altera esta sincronización y en qué medida la disrupción lumínica impacta en mediadores críticos de la barrera colónica. Creemos que a partir de esta primera caracterización de los ritmos biológicos en la inmunidad intestinal podremos ahondar en algunos de los complejos mecanismos que imprimen ritmos que resultan claves para la homeostasis del intestino.

Materiales y Métodos

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la medias \pm SEM. Las diferencias estadísticas entre grupos se determinaron mediante ANAVA de una o dos vías, seguido de un post-hoc de Bonferroni o LSD de Fischer cuando el n por grupo fue distinto. Los análisis estadísticos convencionales se realizaron utilizando el software GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los análisis estadísticos multivariados se realizaron mediante el software Infostat (Infostat versión 2016, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los valores de significancias correspondientes a $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Dado que para realizar un ACP es necesario que todas las variables estudiadas se hayan determinado en un mismo ratón, cuando se realizó este tipo de análisis se evaluaron todos los parámetros considerados en todos los animales muestreados.

El ACP se empleó como análisis exploratorio de datos y para construir modelos predictivos. Se utilizó esta técnica estadística para describir con precisión muchas variables a través de un subconjunto pequeño de ellas con pérdida mínima de información. El análisis generó nuevas variables (componentes principales) que explicaron la variabilidad existente en los datos. A partir de estos componentes se construyeron gráficos de dispersión (Biplot) para visualizar tanto las observaciones como las variables en un mismo espacio. En el ACP el coeficiente de correlación cofenética reportado por InfoStat (0-1) aportó una medida del ajuste de la reducción lograda.

Por otro lado, se utilizó el ADL para describir algebraicamente las relaciones entre dos o más poblaciones (grupos) maximizando las diferencias. Al mismo tiempo con este análisis se obtuvo un algoritmo que permitiría clasificar nuevos casos en los grupos establecidos *a priori* en base a las variables independientes seleccionadas.

El ADL realizado con Infostat proporcionó en su salida estadística la función discriminante correspondiente a cada eje canónico junto con la tasa de error de clasificación o tasa de error aparente (estimadores de la probabilidad de una mala clasificación). Para este análisis se tuvo en cuenta que el número de variables utilizadas fuera igual o menor al número de repeticiones por grupo.

El MANOVA se utilizó para realizar inferencias sobre los efectos del conjunto de variables de manera simultánea. Como test *a posteriori*, se empleó la prueba de Hotelling corregida por la desigualdad de Bonferroni para realizar comparaciones entre grupos.

Animales

En el presente trabajo, se utilizaron ratones de la cepa C57BL6 machos y hembras de 8-10 semanas de edad criados en condiciones libres de patógenos específicos y mantenidos bajo condiciones estándares de temperatura, humedad y ciclos de luz-oscuridad 12:12 (a menos que se detalle lo contrario) en el bioterio del CIBICI (CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Los protocolos de experimentación fueron aprobados por la Comisión de Evaluación de Protocolos con Animales de Experimentación de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Resolución HCD 1412/2012.

Para animales expuestos bajo condiciones de luz u oscuridad constantes durante 48 horas previas al sacrificio se utilizaron cajas especialmente diseñadas para el estudio provistas con un bebedero y comedero de libre acceso para los animales. En el caso de los animales expuestos a luz continua, la intensidad lumínica se determinó mediante la medición de la misma utilizada para los animales luz-oscuridad 12:12 controles.



Figura 44. Cajas de luz u oscuridad utilizadas para los experimentos de disrupción en las condiciones lumínicas equipadas con comederos y bebederos de libre acceso para los animales.

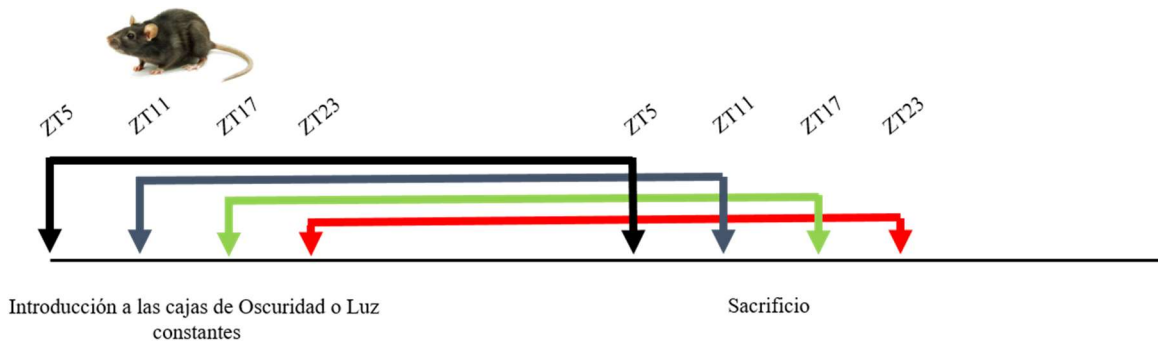


Figura 45. Esquema experimental utilizado para el estudio del impacto de la disrupción en las condiciones lumínicas sobre la inmunidad de mucosas. Para cada grupo experimental (ZT5, ZT11, ZT17 Y ZT23) el ZT al cual se introdujo y se sacrificó los animales fue el mismo.

Citometría de Flujo y Cell sorting

El estudio de la expresión de marcadores de superficie se realizó de la siguiente manera. Brevemente se tomaron 1×10^6 células de la suspensión de GLM, placas de Peyer, bazo o células de lámina propia y se procedió a la marcación durante 30 minutos a 4°C con anticuerpos monoclonales específicos conjugados a distintos fluorocromos detallados en el apartado Reactivos y Anticuerpos. Posteriormente las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer FACS previo a su análisis por mediante el citómetro FACS Canto II (BD Bioscience). Los análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc.).

Para el análisis de la expresión de los factores de transcripción Foxp3 y Tbet, se realizó una citometría intracelular utilizando los reactivos del set de marcación intranuclear para Foxp3 de eBiosciences (eBioscience Cat. No. 00-5523). En primer lugar se realizó la marcación de superficie de las células con anticuerpos anti-CD4, anti-CD45.1 (BD Bioscience) y anti CD45.2 (BD Bioscience) y luego fueron fijadas y permeabilizadas siguiendo el protocolo provisto por el comerciante. Las marcas intranucleares se realizaron con anti-Foxp3-APC (Biolegend) y anti-Tbet-PE (BD Bioscience), incubadas por 20 minutos de 4°C , lavadas y resuspendidas en buffer FACS. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro FACS Canto II BD y los análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc.).

Para el estudio del potencial de las células dendríticas obtenidas de vasos linfáticos aferentes en inducir la expresión de marcadores homing sobre células CD4^+ de GLM in vitro, se

marcaron células totales de GLM con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 APC (BD Bioscience) por 30 minutos a 4°C en buffer FACS en esterilidad. Posteriormente fueron lavadas y resuspendidas en buffer FACS suplementado y purificadas por cell sorter en un Citómetro de Flujo Beckton Dickinson FACS Aria II.

Cultivo de células

Suspensiones de células (1×10^6 células/ml) de GLM o de PP se cultivaron con medio RPMI suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, glutamina al 1% y antibióticos (0,1%). Los estímulos adicionados fueron los anticuerpos anti-CD3 ($2 \mu\text{g/ml}$) + anti-CD28 ($1 \mu\text{g/mL}$). Los sobrenadantes se recogieron 48 hs post cultivo y se utilizaron para determinar citoquinas.

Cultivos de explantos de intestino delgado y colon

Secciones de intestino delgado y de colon fueron abiertas longitudinalmente y lavadas con PBS suplementado con antibióticos al 0,1%. Explantos de aproximadamente 1 cm se cultivaron durante 24 hs en 1 mL de medio RPMI suplementado con 10% de SBF, glutamina al 1% y antibióticos al 0,1% y posteriormente se recogieron los sobrenadantes y se mantuvieron a -80°C hasta realizar las determinaciones de citoquinas y quimioquinas como se describió anteriormente.

Cultivo de vasos linfáticos

Una vez obtenidos los vasos linfáticos se cultivaron con medio RPMI suplementado con SFB al 10%, glutamina al 1% y antibióticos al 0,1% durante 3 hs. Posteriormente, se removió la red de linfáticos del cultivo la cual se homogeneizó mecánicamente con el Ultraturax Homogenizer IKA® para la determinación de proteínas mediante técnica de Western blot; el medio remanente se centrifugó rápidamente a los fines de separar la fase celular y el sobrenadante se reservó para evaluar citoquinas; las células se recuperaron para analizar el fenotipo por citometría de flujo o bien se lisaron mediante solución de lisis para Western blot.

Determinación de citoquinas y quimioquinas

TNF α y MCP-1 (BD Biosciences) o IFN γ , TGF β , IL-6 e IL-10 (BD Pharmingen) se midieron en los sobrenadantes de cultivo mediante el uso de kits de ELISA, tal como está especificado por los fabricantes.

Determinación de Nitritos

La actividad de la enzima iNOS se evaluó por ensayo colorimétrico utilizando el reactivo de Griess, que mide la cantidad de ON liberado. Para ello se tomaron secciones de intestino delgado y de colon de aproximadamente 1 cm de largo en condiciones de esterilidad y en el caso del intestino delgado se descartaron las PP. Las secciones fueron abiertas longitudinalmente, se cultivaron en 1 mL de medio/antibiótico durante 24 hs y al cabo de este tiempo se recolectó el sobrenadante para la determinación de ON. Sobrenadantes libres de células (100 μ L/reservorio) se mezclaron con 200 μ L del reactivo de Griess-1,5% sulfanilamida en HCL 1N y 0,1% dihidrocloruro de N-(1-naftil)etilendiamina en H₂O, y se incubaron 15 min a TA. La absorbancia se midió a 540 nm en un lector de placas (BioRad, Hercules, CA, USA) y la concentración de nitritos se calculó usando una curva estándar de Na₂N₂O₂. Los resultados se expresaron como μ M de ON/1 x 10⁶ células o como μ M de ON/gramo de tejido.

Ensayos de inducción de células regulatorias y efectoras *in vivo*

Para evaluar la inducción de la respuesta efectora de células T *in vivo*, se sortearon células T CD4⁺ de bazo y ganglios linfáticos de ratones OT - II ^{+/-} CD45.2 utilizando FACS Aria Fusion (BD Biosciences) como se describió previamente. 2x10⁶ células se transfirieron retro-orbitalmente a ratones C57BL/6 CD45.1 naïve congénicos. Los ratones recibieron OVA (grado V, Sigma) disuelta en el agua de beber (1,5%) durante 6 días y fueron sacrificados a la misma hora que comenzó su tratamiento con OVA, esto es a ZT11 o ZT23. Por citometría de flujo se evaluaron los niveles intranucleares de los factores de transcripción Foxp3 y T-bet tanto en las células CD4⁺ CD45.2 transferidas como en las CD45.1 receptoras en GLM,

bazo y lámina propia. Además se evaluó mediante ELISA la presencia de IFN γ e IL-10 en sobrenadante de cultivo de estas células incubadas en presencia de OVA (30-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o anti-CD3/anti-CD28 durante 24.

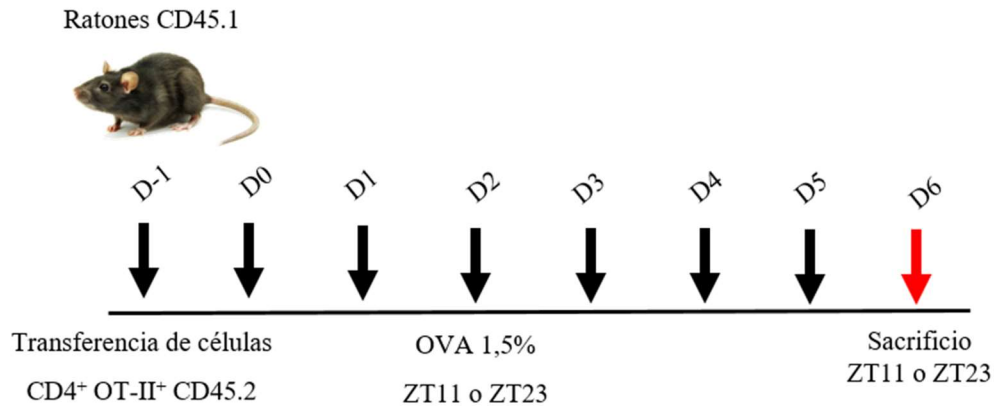


Figura 46. Esquema experimental utilizado para la evaluación de la inducción de la respuesta efectora antigénica específica de células T in vivo.

Ensayo de tolerancia oral

Ratones C57BL/6 WT fueron alimentados con 100 μg OVA (grado V, Sigma) durante 5 días a ZT11 y ZT23. Al día 10 se inmunizaron ratones con adyuvante de Freund completo-OVA (emulsión de 50 μl de CFA (Sigma) y 50 μl de PBS conteniendo 100 μg de OVA) por vía subcutánea en flancos izquierdo y derecho posteriores. Al día 18 se sacrificaron los animales y se obtuvieron los GLM y bazo que fueron disgregados mecánicamente. 1×10^6 células fueron reestimuladas con OVA (30-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 48 hs y los sobrenadantes se analizaron para la presencia de IFN γ e IL-10 por ELISA (BD Biosciences). Los días 0 y 18 del protocolo se obtuvieron muestras de suero de los animales controles y tolerizados y se evaluaron los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos para OVA por ELISA indirecto.

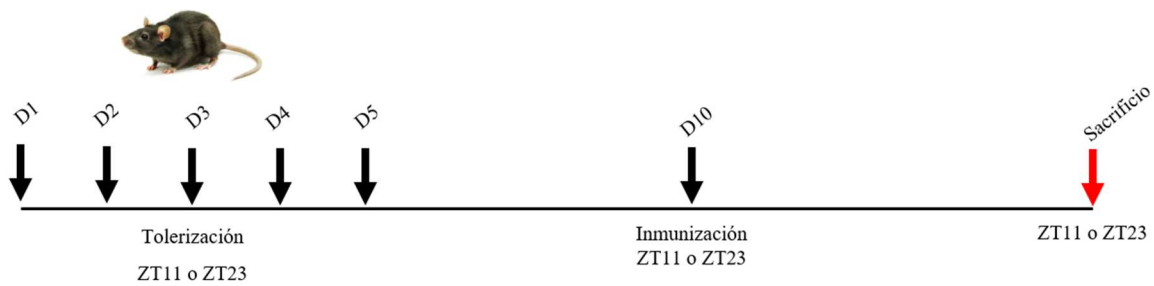


Figura 47. Esquema experimental utilizado para en los ensayos de tolerancia hacia antígenos provenientes de la dieta.

Histología

- **Microscopía Óptica**

Secciones de intestino delgado proximal (duodeno), intermedio (yeyuno) o distal (íleon) y colon distal se fijaron inmediatamente en solución de Carnoy (etanol 6: ácido acético 3: cloroformo 1, v/v/v) durante 2 hs a 4°C y luego se colocaron en etanol 100% hasta su inclusión en parafina. Secciones de 10 µm de espesor fueron montadas en portaobjetos de vidrio y desparafinizadas. Para el análisis histológico general, los cortes fueron teñidos utilizando hematoxilina/eosina (H&E), PAS/AB o AT. Para la evaluación histológica se tuvieron en cuenta cambios o alteraciones en la histoarquitectura, número de células goblet y tipo de mucina producida (ácidas o neutras), integridad de la membrana basal, estado de vacuolización de las microvellosidades y visualización de red linfática en las mismas.

- **Microscopía Electrónica**

Secciones de intestino delgado proximal (duodeno), intermedio (yeyuno) o distal (íleon) y colon distal fueron fijadas inmediatamente en solución fría de 4% paraformaldehído/0,5% glutaraldehído, 0,1 M cacodilato de sodio pH 7,4 por 24 hs a 4°C. Luego se lavaron los fragmentos con cacodilato de sodio y posteriormente se deshidrataron mediante una serie creciente de etanol para finalmente ser embebidas en LR Gold (London Resin Co., Reading, Berkshire UK). Se realizaron secciones (90 nm de grosor) de los distintos tejidos mediante

ultramicrotomo (Reichert Ultracut; Leica, Austria) y colocadas en rejillas de níquel para su marcación con inmunogold.

Obtención de células de órganos linfoides

- **PP y GLM**

Se aislaron las PP de la pared del intestino delgado (5/animal) y los GLM de la cavidad peritoneal, excluyendo el tejido adiposo en el cual se encuentran y la red de vasos linfáticos. Por disgregado mecánico se obtuvieron las suspensiones celulares correspondientes.

- **Vasos linfáticos aferentes**

Se extrajeron los vasos linfáticos aferentes de la cavidad abdominal previa remoción de los GLM.

- **Lámina Propia**

El aislamiento de células de LP de colon se realizó como se detalla a continuación. Se removió el colon de la cavidad abdominal y se limpió cuidadosamente de materia fecal, materia grasa y vasos sanguíneos. Se lavo con PBS-gentamicina (0,1%), se abrió longitudinalmente y se corto en trozos de 0,5 cm aproximadamente. Posteriormente se incubo en medio tampón PBS suplementado con SBF al 10%, 1% de glutamina, 0,1% de gentamicina, 0,1% de antifúngicos y 1 mM de DTT (DL-dithiothreitol, D0632 Sigma Aldrich) durante 15 min a temperatura ambiente en agitación. Se realizó un lavado con PBS (gentamicina 0,1%) y a continuación de realizaron tres incubaciones de 30 minutos a 37°C en agitación en tampon PBS suplementado con SBF al 10%, 1% de glutamina, 0,1% de gentamicina, 0,1% de antifúngicos y EDTA 1 mM. Terminada esta etapa se incubó el tejido *overnight* en medio RPMI completo con colagenasa tipo IV (5 µg/mL). Finalmente se disgregó mecánicamente con malla metálica, se lavó con RPMI y centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en medio RPMI completo.

Obtención y evaluación de mucinas

Luego del sacrificio se procedió a la remoción del intestino delgado y del grueso que fueron colocados en PBS, lavados con solución fisiológica y posteriormente abiertos longitudinalmente. A continuación se procedió al raspado de la cara luminal con bisturí y tanto el raspado luminal como el tejido remanente (que se homogeneizó con Ultraturax Homogenizer IKA®) fueron guardados a -80°C hasta su posterior análisis.

Para determinación de mucinas se puso a punto un método colorimétrico basado en la tinción de glicoproteínas con el método de PAS usado por Mantle y Allen (1978) y readaptado del trabajo de Navarro-García (2010). Para ello 40 µL de contenido intestinal o de homogenato se mezclaron con partes iguales de agua 18x, se agregaron 10 µL de una solución de 7% ácido acético/1% ácido periódico y se incubó durante 2 hs a 37°C. A continuación se agregaron 10 µL de reactivo de Schiff (Sigma-Aldrich) y luego de 5 min se procedió a la lectura a 595 nm en un lector de placas de ELISA (Bio-Rad). Como estandar se utilizó mucina tipo III de cerdo (Sigma Aldrich).

Reactivos y anticuerpos

El LPS utilizado fue de *E. coli* O55-B5 (Sigma). Los anticuerpos anti-CD3 (17A2), anti-CD28 (37.51), anti-CD4 (GK 1.5), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD19 (1D3), anti CD62L (MEL-14), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CD11c (HL3), anti-CD11b (M1/70), anti-CD103 (M290), anti-CD86 (GL1), anti-F4/80 (BM8), anti-MHC-II (25-9-17) anti-CX3CR1 (cat. FAB5825A), anti- $\alpha\beta 7$ (DATK32) y anti-CCR9 (CW-1.2), conjugados a distintos fluorocromos como isotiociano de fluoresceína (FITC), alofococianina (APC), ficoeritrina (PE) y sus derivados PE-Cy5 y PE-Cy7, fueron de la firma BD PharMingen (San Diego, CA, EEUU).

Real Time PCR

La evaluación de los ARNm para los genes del reloj *Bmal1* (ID: Mm00500226_m1), *Per2* (ID: Mm00478113_m1) y *Gapdh* (ID: Mm99999915_g1) se realizó utilizando Taqman Gene Expression Assay de Thermo Fisher Scientific. El ARN total se extrajo con TRIzol® (Life Technologies, Gibco) y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260/280nm (Biotek Sinergy

HT). La transcripción reversa se realizó tomando 2µg de ARN total e incubando con 0,25µg de oligo (Pabst et al.) (Biodynamics, BuenosAires, Argentina) por 5 min a 70°C. Las muestras se incubaron durante 1 h a 42°C con 25 U del inhibidor de Ribonuclease (RNasin)(Promega, Madison, WI), deoxinucleoside trifosfato 1,25 mM (Invitrogen, LifeTechnologies, CA) y 200 U M-MLV de transcriptasa reversa (Promega) en el tampón de reacción MMLV 5X (Promega) en un volumen final de 20µL.

La real time PCR se realizó en Step One Plus Detection System (Real-Time PCR System- Thermo Fisher Scientific). Cada mezcla de reacción tuvo 1µL de ADNc con 0,3 µl de los primers sentido y anti-sentido correspondientes, 6 µl de 2x TaqMan® Master Mix (Applied Biosystem, Life Technologies, Brasil) y agua DEPC hasta completar un volumen total de 12 µL por muestra. Cada corrida se realizó con un ciclo de 10 min a 95°C para la activación de la enzima polimerasa, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 10 seg y 60°C por 1 min. La expresión de los genes blanco se relativizó con β-actina y el nivel de expresión para cada gen se calculó utilizando el método $\Delta\Delta CT$ (delta delta CT). El valor obtenido se usó para comparar el nivel de expresión para cada molécula.

Western blot

Las células obtenidas de vasos linfáticos se lisaron mediante solución de lisis. Las alícuotas de los homogenatos o de los lisados celulares se diluyeron en tampón de corrida y se calentaron a 100°C durante 10 min. Los antígenos presentes en el lisado celular se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15% (D6), 12,5% (CCL21) o 7,5% (Muc-2). Se sembraron 100 µg de proteína/calle, se realizó la corrida electroforética a 140 V y se transfirió, por intervalo de 1 h a 100 V, a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon 120 min en tampón TRIS-solución salina (TBS, pH 7,2-7,4)-3% leche y luego se incubaron 12 hs a 4°C con los distintos anticuerpos a las diluciones que se indica: 1:250 anti-D6 (Abcam), 1:1000 anti-CCL21 (Abcam), 1:200 de anti-Muc2 (Abcam) y 1:1000 anti-β-actina como control de carga (Cell Signaling). Las membranas se lavaron con TBS-0,05% Tween 20 y se incubaron con

anticuerpos de ratón anti-IgG de conejo conjugados con IRDye800CW (1:15000) (LI-COR Biosciences) para CCL21 y β -actina; anti-IgG de cabra conjugado con IRDye680RD (1:15000) (LI-COR Biosciences) para D6; y anti-IgG de ratón conjugado con IRDye680CW (1:15000) (LI-COR Biosciences) para Muc2 . La inmunodetección se realizó mediante Odyssey® Imaging System (LI-COR Biosciences), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Bibliografía

Bibliografía

- Adams, K. L., Castanon-Cervantes, O., Evans, J. A., & Davidson, A. J. (2013). Environmental Circadian Disruption Elevates the IL-6 Response to Lipopolysaccharide in Blood. *Journal of Biological Rhythms*, 28(4), 272-277. doi:10.1177/0748730413494561
- Adams, K. L., Castanon-Cervantes, O., Evans, J. A., & Davidson, A. J. (2013). Environmental circadian disruption elevates the IL-6 response to lipopolysaccharide in blood. *J Biol Rhythms*, 28(4), 272-277. doi:10.1177/0748730413494561
- Archer, S. N., Laing, E. E., Moller-Levet, C. S., van der Veen, D. R., Bucca, G., Lazar, A. S., . . . Dijk, D. J. (2014). Mistimed sleep disrupts circadian regulation of the human transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(6), E682-691. doi:10.1073/pnas.1316335111
- Arjona, A., & Sarkar, D. K. (2006a). The circadian gene mPer2 regulates the daily rhythm of IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res*, 26(9), 645-649. doi:10.1089/jir.2006.26.645
- Arjona, A., & Sarkar, D. K. (2006b). Evidence supporting a circadian control of natural killer cell function. *Brain Behav Immun*, 20(5), 469-476. doi:10.1016/j.bbi.2005.10.002
- Balsalobre, A. (2002). Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res*, 309(1), 193-199. doi:10.1007/s00441-002-0585-0
- Bamias, G., & Cominelli, F. (2016). Cytokines and intestinal inflammation. *Curr Opin Gastroenterol*, 32(6), 437-442. doi:10.1097/mog.0000000000000315
- Beauséjour, M., Thibodeau, S., Demers, M.-J., Bouchard, V., Gauthier, R., Beaulieu, J.-F., & Vachon, P. H. (2013). Suppression of anoikis in human intestinal epithelial cells: differentiation state-selective roles of $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, and $\alpha 6\beta 4$ integrins. *BMC Cell Biology*, 14(1), 53. doi:10.1186/1471-2121-14-53
- Bedrosian, T. A., Fonken, L. K., & Nelson, R. J. (2016). Endocrine Effects of Circadian Disruption. *Annu Rev Physiol*, 78, 109-131. doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105102

- Bedrosian, T. A., Fonken, L. K., Walton, J. C., & Nelson, R. J. (2011). Chronic exposure to dim light at night suppresses immune responses in Siberian hamsters. *Biol Lett*, 7(3), 468-471. doi:10.1098/rsbl.2010.1108
- Bellet, M. M., Deriu, E., Liu, J. Z., Grimaldi, B., Blaschitz, C., Zeller, M., . . . Sassone-Corsi, P. (2013). Circadian clock regulates the host response to Salmonella. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), 9897-9902. doi:10.1073/pnas.1120636110
- Birchenough, G. M., Nystrom, E. E., Johansson, M. E., & Hansson, G. C. (2016). A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science*, 352(6293), 1535-1542. doi:10.1126/science.aaf7419
- Blancas-Velazquez, A., Mendoza, J., Garcia, A. N., & la Fleur, S. E. (2017). Diet-Induced Obesity and Circadian Disruption of Feeding Behavior. *Front Neurosci*, 11, 23. doi:10.3389/fnins.2017.00023
- Bollinger, T., Bollinger, A., Skrum, L., Dimitrov, S., Lange, T., & Solbach, W. (2009). Sleep-dependent activity of T cells and regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*, 155(2), 231-238. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03822.x
- Bron, R., & Furness, J. B. (2009). Rhythm of digestion: keeping time in the gastrointestinal tract. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 36(10), 1041-1048. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05254.x
- Bunger, M. K., Wilsbacher, L. D., Moran, S. M., Clendenin, C., Radcliffe, L. A., Hogenesch, J. B., . . . Bradfield, C. A. (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103(7), 1009-1017.
- Buxton, O. M., Cain, S. W., O'Connor, S. P., Porter, J. H., Duffy, J. F., Wang, W., . . . Shea, S. A. (2012). Adverse metabolic consequences in humans of prolonged sleep restriction combined with circadian disruption. *Sci Transl Med*, 4(129), 129ra143. doi:10.1126/scitranslmed.3003200
- Campbell, D. J., & Butcher, E. C. (2002). Rapid Acquisition of Tissue-specific Homing Phenotypes by CD4⁺ T Cells Activated in Cutaneous or Mucosal Lymphoid Tissues. *J Exp Med*, 195(1), 135-141. doi:10.1084/jem.20011502

- Cao, Y., & Wang, R. H. (2017). Associations among Metabolism, Circadian Rhythm and Age-Associated Diseases. *Aging Dis*, 8(3), 314-333. doi:10.14336/ad.2016.1101
- Castanon-Cervantes, O., Wu, M., Ehlen, J. C., Paul, K., Gamble, K. L., Johnson, R. L., . . . Davidson, A. J. (2010). Dysregulation of Inflammatory Responses by Chronic Circadian Disruption. *The Journal of Immunology*, 185(10), 5796-5805. doi:10.4049/jimmunol.1001026
- Castanon-Cervantes, O., Wu, M., Ehlen, J. C., Paul, K., Gamble, K. L., Johnson, R. L., . . . Davidson, A. J. (2010). Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption. *J Immunol*, 185(10), 5796-5805. doi:10.4049/jimmunol.1001026
- Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., & Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, 204(8), 1757-1764. doi:10.1084/jem.20070590
- Cuesta, M., Boudreau, P., Dubeau-Laramée, G., Cermakian, N., & Boivin, D. B. (2016). Simulated Night Shift Disrupts Circadian Rhythms of Immune Functions in Humans. *J Immunol*, 196(6), 2466-2475. doi:10.4049/jimmunol.1502422
- Challet, E. (2014). [Circadian clocks and energy metabolism in rodents]. *Biol Aujourd'hui*, 208(4), 269-274. doi:10.1051/jbio/2015002
- Chokshi, N. K., Guner, Y. S., Hunter, C. J., Upperman, J. S., Grishin, A., & Ford, H. R. (2008). The Role of Nitric Oxide in Intestinal Epithelial Injury and Restitution in Neonatal Necrotizing Enterocolitis. *Seminars in Perinatology*, 32(2), 92-99. doi:<http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2008.01.002>
- Damasceno, A., Moraes, A. S., Farias, A., Damasceno, B. P., dos Santos, L. M., & Cendes, F. (2015). Disruption of melatonin circadian rhythm production is related to multiple sclerosis severity: A preliminary study. *J Neurol Sci*, 353(1-2), 166-168. doi:10.1016/j.jns.2015.03.040
- Dauchy, R. T., Xiang, S., Mao, L., Brimer, S., Wren, M. A., Yuan, L., . . . Hill, S. M. (2014). Circadian and melatonin disruption by exposure to light at night drives intrinsic resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Cancer Res*, 74(15), 4099-4110. doi:10.1158/0008-5472.can-13-3156

- De Calisto, J., Villablanca, E. J., & Mora, J. R. (2012). FcγRI (CD64): an identity card for intestinal macrophages. *Eur J Immunol*, *42*(12), 3136-3140. doi:10.1002/eji.201243061
- Denning, T. L., Norris, B. A., Medina-Contreras, O., Manicassamy, S., Geem, D., Madan, R., . . . Pulendran, B. (2011). Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. *J Immunol*, *187*(2), 733-747. doi:10.4049/jimmunol.1002701
- Dimitrov, S., Benedict, C., Heutling, D., Westermann, J., Born, J., & Lange, T. (2009). Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood*, *113*(21), 5134-5143. doi:10.1182/blood-2008-11-190769
- Druzd, D., de Juan, A., & Scheiermann, C. (2014). Circadian rhythms in leukocyte trafficking. *Semin Immunopathol*, *36*(2), 149-162. doi:10.1007/s00281-013-0414-4
- Druzd, D., Matveeva, O., Ince, L., Harrison, U., He, W., Schmal, C., . . . Scheiermann, C. (2017). Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses. *Immunity*, *46*(1), 120-132. doi:10.1016/j.immuni.2016.12.011
- Duez, H., & Staels, B. (2008a). The nuclear receptors Rev-erbs and RORs integrate circadian rhythms and metabolism. *Diab Vasc Dis Res*, *5*(2), 82-88. doi:10.3132/dvdr.2008.0014
- Duez, H., & Staels, B. (2008b). Rev-erb alpha gives a time cue to metabolism. *FEBS Lett*, *582*(1), 19-25. doi:10.1016/j.febslet.2007.08.032
- Edelblum, K. L., Yan, F., Yamaoka, T., & Polk, D. B. (2006). Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflammatory Bowel Diseases*, *12*(5), 413-424. doi:10.1097/01.MIB.0000217334.30689.3e
- Elias, K. M., Laurence, A., Davidson, T. S., Stephens, G., Kanno, Y., Shevach, E. M., & O'Shea, J. J. (2008). Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood*, *111*(3), 1013-1020. doi:10.1182/blood-2007-06-096438

- Faderl, M., Noti, M., Corazza, N., & Mueller, C. (2015). Keeping bugs in check: The mucus layer as a critical component in maintaining intestinal homeostasis. *IUBMB Life*, 67(4), 275-285. doi:10.1002/iub.1374
- Farache, J., Zigmond, E., Shakhar, G., & Jung, S. (2013). Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. *Immunol Cell Biol*, 91(3), 232-239. doi:10.1038/icb.2012.79
- Feillet, C. A., Albrecht, U., & Challet, E. (2006). "Feeding time" for the brain: a matter of clocks. *J Physiol Paris*, 100(5-6), 252-260. doi:10.1016/j.jphysparis.2007.05.002
- Fonken, L. K., Workman, J. L., Walton, J. C., Weil, Z. M., Morris, J. S., Haim, A., & Nelson, R. J. (2010). Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(43), 18664-18669. doi:10.1073/pnas.1008734107
- Fortier, E. E., Rooney, J., Dardente, H., Hardy, M. P., Labrecque, N., & Cermakian, N. (2011). Circadian variation of the response of T cells to antigen. *J Immunol*, 187(12), 6291-6300. doi:10.4049/jimmunol.1004030
- Froy, O., & Chapnik, N. (2007). Circadian oscillation of innate immunity components in mouse small intestine. *Mol Immunol*, 44(8), 1954-1960. doi:10.1016/j.molimm.2006.09.026
- Gibbs, J., Ince, L., Matthews, L., Mei, J., Bell, T., Yang, N., . . . Loudon, A. (2014). An epithelial circadian clock controls pulmonary inflammation and glucocorticoid action. *Nat Med*, 20(8), 919-926. doi:10.1038/nm.3599
- <http://www.nature.com/nm/journal/v20/n8/abs/nm.3599.html#supplementary-information>
- Glotzer, D. J., Glick, M. E., & Goldman, H. Proctitis and colitis following diversion of the fecal stream. *Gastroenterology*, 80(3), 438-441. doi:10.5555/uri:pii:0016508581900032
- Graham, G. J., & Locati, M. (2013). Regulation of the immune and inflammatory responses by the 'atypical' chemokine receptor D6. *J Pathol*, 229(2), 168-175. doi:10.1002/path.4123
- Green, C. B., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2008). The meter of metabolism. *Cell*, 134(5), 728-742. doi:10.1016/j.cell.2008.08.022

- Grishin, A., Bowling, J., Bell, B., Wang, J., & Ford, H. R. (2016). Roles of nitric oxide and intestinal microbiota in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery*, *51*(1), 13-17.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.10.006>
- Grootjans, J., Thuijls, G., Derikx, J. P., van Dam, R. M., Dejong, C. H., & Buurman, W. A. (2011). Rapid lamina propria retraction and zipper-like constriction of the epithelium preserves the epithelial lining in human small intestine exposed to ischaemia-reperfusion. *J Pathol*, *224*(3), 411-419. doi:10.1002/path.2882
- Grosbellet, E., Dumont, S., Schuster-Klein, C., Guardiola-Lemaitre, B., Pevet, P., Criscuolo, F., & Challet, E. (2016). Circadian phenotyping of obese and diabetic db/db mice. *Biochimie*, *124*, 198-206.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.06.029>
- Guerrero-Vargas, N. N., Guzman-Ruiz, M., Fuentes, R., Garcia, J., Salgado-Delgado, R., Basualdo Mdel, C., . . . Buijs, R. M. (2015). Shift Work in Rats Results in Increased Inflammatory Response after Lipopolysaccharide Administration: A Role for Food Consumption. *J Biol Rhythms*, *30*(4), 318-330. doi:10.1177/0748730415586482
- Habtezion, A., Nguyen, L. P., Hadeiba, H., & Butcher, E. C. (2016). Leukocyte Trafficking to the Small Intestine and Colon. *Gastroenterology*, *150*(2), 340-354.
doi:10.1053/j.gastro.2015.10.046
- Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., . . . Ishikawa, H. (2002). Identification of Multiple Isolated Lymphoid Follicles on the Antimesenteric Wall of the Mouse Small Intestine. *The Journal of Immunology*, *168*(1), 57-64. doi:10.4049/jimmunol.168.1.57
- Hatori, M., & Panda, S. (2015). Response of peripheral rhythms to the timing of food intake. *Methods Enzymol*, *552*, 145-161. doi:10.1016/bs.mie.2014.10.027
- Hayashi, M., Shimba, S., & Tezuka, M. (2007). Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. *Biol Pharm Bull*, *30*(4), 621-626.
- Hellwig, C. T., Passante, E., & Rehm, M. (2011). The molecular machinery regulating apoptosis signal transduction and its implication in human physiology and pathophysiology. *Curr Mol Med*, *11*. doi:10.2174/156652411794474400

- Hemmers, S., & Rudensky, A. Y. (2015). The Cell-Intrinsic Circadian Clock Is Dispensable for Lymphocyte Differentiation and Function. *Cell Rep*, *11*(9), 1339-1349. doi:10.1016/j.celrep.2015.04.058
- Hoffman, R. A., Zhang, G., Nussler, N. C., Gleixner, S. L., Ford, H. R., Simmons, R. L., & Watkins, S. C. (1997). Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in the mouse ileal mucosa. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *272*(2), G383-G392.
- Hoogerwerf, W. A., Hellmich, H. L., Cornelissen, G., Halberg, F., Shahinian, V. B., Bostwick, J., . . . Cassone, V. M. (2007). Clock gene expression in the murine gastrointestinal tract: endogenous rhythmicity and effects of a feeding regimen. *Gastroenterology*, *133*(4), 1250-1260. doi:10.1053/j.gastro.2007.07.009
- Hoogerwerf, W. A., Sinha, M., Conesa, A., Luxon, B. A., Shahinian, V. B., Cornelissen, G., . . . Cassone, V. M. (2008). Transcriptional profiling of mRNA expression in the mouse distal colon. *Gastroenterology*, *135*(6), 2019-2029. doi:10.1053/j.gastro.2008.08.048
- Hussain, M. M. (2014). Regulation of intestinal lipid absorption by clock genes. *Annu Rev Nutr*, *34*, 357-375. doi:10.1146/annurev-nutr-071813-105322
- Hussain, M. M., & Pan, X. (2009). Clock genes, intestinal transport and plasma lipid homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*, *20*(4), 177-185. doi:10.1016/j.tem.2009.01.001
- Hussain, M. M., & Pan, X. (2015). Circadian regulators of intestinal lipid absorption. *J Lipid Res*, *56*(4), 761-770. doi:10.1194/jlr.R051573
- Johns, C. E., Newton, J. L., Westley, B. R., & May, F. E. (2005). The diurnal rhythm of the cytoprotective human trefoil protein TFF2 is reduced by factors associated with gastric mucosal damage: ageing, Helicobacter pylori infection, and sleep deprivation. *Am J Gastroenterol*, *100*(7), 1491-1497. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.41859.x
- Kang, S. G., Lim, H. W., Andrisani, O. M., Broxmeyer, H. E., & Kim, C. H. (2007). Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol*, *179*(6), 3724-3733.

- Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, G. D., Herzog, E. D., Volk, H. D., . . . Maier, B. (2009). A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(50), 21407-21412.
doi:10.1073/pnas.0906361106
- Kiessling, S., Beaulieu-Laroche, L., Blum, I. D., Landgraf, D., Welsh, D. K., Storch, K. F., . . . Cermakian, N. (2017). Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth. *BMC Biol*, *15*(1), 13. doi:10.1186/s12915-017-0349-7
- Kim, S. V., Xiang, W. V., Kwak, C., Yang, Y., Lin, X. W., Ota, M., . . . Littman, D. R. (2013). GPR15-mediated homing controls immune homeostasis in the large intestine mucosa. *Science*, *340*(6139), 1456-1459. doi:10.1126/science.1237013
- Kohsaka, A., & Bass, J. (2007). A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, *18*(1), 4-11. doi:10.1016/j.tem.2006.11.005
- Labrecque, N., & Cermakian, N. (2015). Circadian Clocks in the Immune System. *J Biol Rhythms*, *30*(4), 277-290. doi:10.1177/0748730415577723
- Lee, K. M., Nibbs, R. J., & Graham, G. J. (2013). D6: the 'crowd controller' at the immune gateway. *Trends Immunol*, *34*(1), 7-12. doi:10.1016/j.it.2012.08.001
- Leone, V., Gibbons, S. M., Martinez, K., Hutchison, A. L., Huang, E. Y., Cham, C. M., . . . Chang, E. B. (2015). Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell Host Microbe*, *17*(5), 681-689. doi:10.1016/j.chom.2015.03.006
- Liu, J., Malkani, G., Shi, X., Meyer, M., Cunningham-Rundles, S., Ma, X., & Sun, Z. S. (2006). The circadian clock Period 2 gene regulates gamma interferon production of NK cells in host response to lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *Infect Immun*, *74*(8), 4750-4756. doi:10.1128/iai.00287-06
- Longo, V. D., & Panda, S. (2016). Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell Metab*, *23*(6), 1048-1059.
doi:10.1016/j.cmet.2016.06.001
- Lovett-Racke, A. E., & Racke, M. K. (2002). Retinoic acid promotes the development of Th2-like human myelin basic protein-reactive T cells. *Cell Immunol*, *215*(1), 54-60.

- Macpherson, A. J., & Uhr, T. (2004). Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science*, *303*(5664), 1662-1665.
doi:10.1126/science.1091334
- Manicassamy, S., Ravindran, R., Deng, J., Oluoch, H., Denning, T. L., Kasturi, S. P., . . . Pulendran, B. (2009). TLR2 dependent induction of vitamin A metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits T(H)-17 mediated autoimmunity. *Nat Med*, *15*(4), 401-409. doi:10.1038/nm.1925
- Mao, H., Seo, S. J., Biswal, M. R., Li, H., Conners, M., Nandyala, A., . . . Lewin, A. S. (2014). Mitochondrial Oxidative Stress in the Retinal Pigment Epithelium Leads to Localized Retinal Degeneration Mouse Model of Retinal Atrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *55*(7), 4613-4627. doi:10.1167/iovs.14-14633
- Marco, E. M., Velarde, E., Llorente, R., & Laviola, G. (2016). Disrupted Circadian Rhythm as a Common Player in Developmental Models of Neuropsychiatric Disorders. *Curr Top Behav Neurosci*, *29*, 155-181. doi:10.1007/7854_2015_419
- Marcheva, B., Ramsey, K. M., Buhr, E. D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C. H., . . . Bass, J. (2010). Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*, *466*(7306), 627-631.
doi:10.1038/nature09253
- Martinez, C. A. R., Nonose, R., Spadari, A. P. P., Máximo, F. R., Priolli, D. G., Pereira, J. A., & Margarido, N. F. (2010). Quantification by computerized morphometry of tissue levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, *25*, 231-240.
- Matthijsen, R. A., Derikx, J. P., Kuipers, D., van Dam, R. M., Dejong, C. H., & Buurman, W. A. (2009). Enterocyte shedding and epithelial lining repair following ischemia of the human small intestine attenuate inflammation. *PLoS One*, *4*(9), e7045.
doi:10.1371/journal.pone.0007045
- McDonald, K. G., Leach, M. R., Brooke, K. W. M., Wang, C., Wheeler, L. W., Hanly, E. K., . . . Newberry, R. D. (2012). Epithelial Expression of the Cytosolic Retinoid Chaperone Cellular Retinol Binding Protein II Is Essential for *in Vivo* Imprinting of Local Gut Dendritic Cells by Luminal Retinoids. *The American Journal of Pathology*, *180*(3), 984-997. doi:10.1016/j.ajpath.2011.11.009

- McFadden, E., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2014). The relationship between obesity and exposure to light at night: cross-sectional analyses of over 100,000 women in the Breakthrough Generations Study. *Am J Epidemiol*, *180*(3), 245-250. doi:10.1093/aje/kwu117
- McKimmie, C. S., Singh, M. D., Hewit, K., Lopez-Franco, O., Le Brocq, M., Rose-John, S., . . . Graham, G. J. (2013). An analysis of the function and expression of D6 on lymphatic endothelial cells. *Blood*, *121*(18), 3768-3777. doi:10.1182/blood-2012-04-425314
- Mendoza, J., Graff, C., Dardente, H., Pevet, P., & Challet, E. (2005). Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci*, *25*(6), 1514-1522. doi:10.1523/jneurosci.4397-04.2005
- Moller-Levet, C. S., Archer, S. N., Bucca, G., Laing, E. E., Slak, A., Kabiljo, R., . . . Dijk, D. J. (2013). Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(12), E1132-1141. doi:10.1073/pnas.1217154110
- Moore, S. R., Pruszka, J., Vallance, J., Aihara, E., Matsuura, T., Montrose, M. H., . . . Hong, C. I. (2014). Robust circadian rhythms in organoid cultures from PERIOD2::LUCIFERASE mouse small intestine. *Dis Model Mech*, *7*(9), 1123-1130. doi:10.1242/dmm.014399
- Morrison, V. L., Barr, T. A., Brown, S., & Gray, D. (2010). TLR-Mediated Loss of CD62L Focuses B Cell Traffic to the Spleen during *Salmonella typhimurium* Infection. *The Journal of Immunology*, *185*(5), 2737-2746. doi:10.4049/jimmunol.1000758
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*, *14*(10), 667-685. doi:10.1038/nri3738
- Mucida, D., Pino-Lagos, K., Kim, G., Nowak, E., Benson, M. J., Kronenberg, M., . . . Cheroutre, H. (2009). Retinoic Acid Can Directly Promote TGF- β -Mediated Foxp3(+) Treg Cell Conversion of Naive T Cells. *Immunity*, *30*(4), 471-473. doi:10.1016/j.immuni.2009.03.008

- Mukherji, A., Kobiita, A., Ye, T., & Chambon, P. (2013). Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs. *Cell*, *153*(4), 812-827. doi:10.1016/j.cell.2013.04.020
- Nguyen, K. D., Fentress, S. J., Qiu, Y., Yun, K., Cox, J. S., & Chawla, A. (2013). Circadian Gene *Bmal1* Regulates Diurnal Oscillations of Ly6C^{hi} Inflammatory Monocytes. *Science*, *341*(6153), 1483-1488. doi:10.1126/science.1240636
- Nguyen, L. P., Pan, J., Dinh, T. T., Hadeiba, H., O'Hara, E., 3rd, Ebtikar, A., . . . Habtezion, A. (2015). Role and species-specific expression of colon T cell homing receptor GPR15 in colitis. *Nat Immunol*, *16*(2), 207-213. doi:10.1038/ni.3079
- Nishio, J., & Honda, K. (2012). Immunoregulation by the gut microbiota. *Cell Mol Life Sci*, *69*(21), 3635-3650. doi:10.1007/s00018-012-0993-6
- Nonose, R., Spadari, A. P. P., Priolli, D. G., Máximo, F. R., Pereira, J. A., & Martinez, C. A. R. (2009). Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, *24*, 267-275.
- O'Garra, A., & Vieira, P. (2007). T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*, *7*(6), 425-428. doi:10.1038/nri2097
- Pabst, O., Herbrand, H., Worbs, T., Friedrichsen, M., Yan, S., Hoffmann, M. W., . . . Förster, R. (2005). Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol*, *35*(1), 98-107. doi:10.1002/eji.200425432
- Pacha, J., & Sumova, A. (2013). Circadian regulation of epithelial functions in the intestine. *Acta Physiol (Oxf)*, *208*(1), 11-24. doi:10.1111/apha.12090
- Paladino, N., Leone, M. J., Plano, S. A., & Golombek, D. A. (2010). Paying the circadian toll: the circadian response to LPS injection is dependent on the Toll-like receptor 4. *J Neuroimmunol*, *225*(1-2), 62-67. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.04.015
- Pan, X., & Hussain, M. M. (2009). Clock is important for food and circadian regulation of macronutrient absorption in mice. *J Lipid Res*, *50*(9), 1800-1813. doi:10.1194/jlr.M900085-JLR200
- Panda, S. (2016). Circadian physiology of metabolism. *Science*, *354*(6315), 1008-1015. doi:10.1126/science.aah4967

- Phillips, D. J., Savenkova, M. I., & Karatsoreos, I. N. (2015). Environmental disruption of the circadian clock leads to altered sleep and immune responses in mouse. *Brain Behav Immun*, *47*, 14-23. doi:10.1016/j.bbi.2014.12.008
- Potter, G. D., Cade, J. E., Grant, P. J., & Hardie, L. J. (2016). Nutrition and the circadian system. *Br J Nutr*, 1-9. doi:10.1017/s0007114516002117
- Rescigno, M. (2009). Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *119*(9), 2441-2450. doi:10.1172/jci39134
- Roberts, P. J., Riley, G. P., Morgan, K., Miller, R., Hunter, J. O., & Middleton, S. J. (2001). The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon. *Journal of Clinical Pathology*, *54*(4), 293-297. doi:10.1136/jcp.54.4.293
- Rott, L. S., Briskin, M. J., & Butcher, E. C. (2000). Expression of $\alpha 4\beta 7$ and E-selectin ligand by circulating memory B cells: implications for targeted trafficking to mucosal and systemic sites. *J Leukoc Biol*, *68*(6), 807-814.
- Sahar, S., & Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nat Rev Cancer*, *9*(12), 886-896. doi:10.1038/nrc2747
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y., & Frenette, P. S. (2013). Circadian control of the immune system. *Nature reviews. Immunology*, *13*(3), 190-198. doi:10.1038/nri3386
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y., Lucas, D., Chow, A., Jang, J.-E., Zhang, D., . . . Frenette, Paul S. (2012). Adrenergic Nerves Govern Circadian Leukocyte Recruitment to Tissues. *Immunity*, *37*(2), 290-301. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.021>
- Scheving, L. A. (2000). Biological clocks and the digestive system. *Gastroenterology*, *119*(2), 536-549. doi:<http://dx.doi.org/10.1053/gast.2000.9305>
- Shan, M., Gentile, M., Yeiser, J. R., Walland, A. C., Bornstein, V. U., Chen, K., . . . Cerutti, A. (2013). Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science*, *342*(6157), 447-453. doi:10.1126/science.1237910
- Shiow, L. R., Rosen, D. B., Brdickova, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L. L., . . . Matloubian, M. (2006). CD69 acts downstream of interferon-[alpha]/[beta] to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*, *440*(7083), 540-544.

doi:http://www.nature.com/nature/journal/v440/n7083/supinfo/nature04606_S1.html

- Silva-Sanchez, A., & Randall, T. D. Fugue G Minor: Getting the Lymph Node Ensemble Together with Circadian Rhythm. *Immunity*, 46(1), 6-8.
doi:10.1016/j.immuni.2017.01.001
- Silver, A. C., Arjona, A., Hughes, M. E., Nitabach, M. N., & Fikrig, E. (2012). Circadian expression of clock genes in mouse macrophages, dendritic cells, and B cells. *Brain Behav Immun*, 26(3), 407-413. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2011.10.001>
- Silver, Adam C., Arjona, A., Walker, Wendy E., & Fikrig, E. The Circadian Clock Controls Toll-like Receptor 9-Mediated Innate and Adaptive Immunity. *Immunity*, 36(2), 251-261. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.017
- Silver, A. C., Arjona, A., Walker, W. E., & Fikrig, E. (2012). The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity*, 36(2), 251-261. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.017
- Singer, II, Kawka, D. W., Scott, S., Weidner, J. R., Mumford, R. A., Riehl, T. E., & Stenson, W. F. (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 111(4), 871-885. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(96\)70055-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(96)70055-0)
- Stenstad, H., Ericsson, A., Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Marsal, J., Mack, M., . . . Agace, W. W. (2006). Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4+ T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood*, 107(9), 3447-3454. doi:10.1182/blood-2005-07-2860
- Stenstad, H., Svensson, M., Cucak, H., Kotarsky, K., & Agace, W. W. (2007). Differential homing mechanisms regulate regionalized effector CD8 α beta+ T cell accumulation within the small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(24), 10122-10127. doi:10.1073/pnas.0700269104
- Sun, Y., Yang, Z., Niu, Z., Peng, J., Li, Q., Xiong, W., . . . Zhao, Y. (2006). MOP3, a component of the molecular clock, regulates the development of B cells. *Immunology*, 119(4), 451-460. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02456.x

- Suwazono, Y., Dochi, M., Sakata, K., Okubo, Y., Oishi, M., Tanaka, K., . . . Nogawa, K. (2008). A longitudinal study on the effect of shift work on weight gain in male Japanese workers. *Obesity (Silver Spring)*, *16*(8), 1887-1893. doi:10.1038/oby.2008.298
- Svensson, M., Marsal, J., Ericsson, A., Carramolino, L., Broden, T., Marquez, G., & Agace, W. W. (2002). CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alpha(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J Clin Invest*, *110*(8), 1113-1121. doi:10.1172/jci15988
- Tamoutounour, S., Henri, S., Lelouard, H., de Bovis, B., de Haar, C., van der Woude, C. J., . . . Guilliams, M. (2012). CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *Eur J Immunol*, *42*(12), 3150-3166. doi:10.1002/eji.201242847
- Tanabe, K., Kitagawa, E., Wada, M., Haraguchi, A., Orihara, K., Tahara, Y., . . . Shibata, S. (2015). Antigen exposure in the late light period induces severe symptoms of food allergy in an OVA-allergic mouse model. *Sci Rep*, *5*, 14424. doi:10.1038/srep14424
- Teboul, M., Grechez-Cassiau, A., Guillaumond, F., & Delaunay, F. (2009). How nuclear receptors tell time. *J Appl Physiol (1985)*, *107*(6), 1965-1971. doi:10.1152/jappphysiol.00515.2009
- Thaiss, C. A., Levy, M., Korem, T., Dohnalova, L., Shapiro, H., Jaitin, D. A., . . . Elinav, E. (2016). Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations. *Cell*, *167*(6), 1495-1510.e1412. doi:10.1016/j.cell.2016.11.003
- Thaiss, Christoph A., Zeevi, D., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Tengeler, Anouk C., . . . Elinav, E. Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis. *Cell*, *159*(3), 514-529. doi:10.1016/j.cell.2014.09.048
- Thaiss, C. A., Zeevi, D., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Tengeler, A. C., . . . Elinav, E. (2014). Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell*, *159*(3), 514-529. doi:10.1016/j.cell.2014.09.048
- Tomura, M., Itoh, K., & Kanagawa, O. (2010). Naive CD4⁺ T Lymphocytes Circulate through Lymphoid Organs To Interact with Endogenous Antigens and

- Upregulate Their Function. *The Journal of Immunology*, 184(9), 4646-4653.
doi:10.4049/jimmunol.0903946
- Vicente-Suarez, I., Larange, A., Reardon, C., Matho, M., Feau, S., Chodaczek, G., . . . Cheroutre, H. (2015). Unique Lamina Propria Stromal Cells Imprint the Functional Phenotype of Mucosal Dendritic Cells. *Mucosal Immunol*, 8(1), 141-151.
doi:10.1038/mi.2014.51
- Voigt, R. M., Forsyth, C. B., Green, S. J., Mutlu, E., Engen, P., Vitaterna, M. H., . . . Keshavarzian, A. (2014). Circadian Disorganization Alters Intestinal Microbiota. *PLoS One*, 9(5), e97500. doi:10.1371/journal.pone.0097500
- Voigt, R. M., Summa, K. C., Forsyth, C. B., Green, S. J., Engen, P., Naqib, A., . . . Keshavarzian, A. (2016). The Circadian Clock Mutation Promotes Intestinal Dysbiosis. *Alcohol Clin Exp Res*, 40(2), 335-347. doi:10.1111/acer.12943
- Wang, Y., Pati, P., Xu, Y., Chen, F., Stepp, D. W., Huo, Y., . . . Fulton, D. J. (2016). Endotoxin Disrupts Circadian Rhythms in Macrophages via Reactive Oxygen Species. *PLoS One*, 11(5), e0155075. doi:10.1371/journal.pone.0155075
- Wu, T., Yao, C., Huang, L., Mao, Y., Zhang, W., Jiang, J., & Fu, Z. (2015). Nutrients and Circadian Rhythms in Mammals. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 61 Suppl, S89-91.
doi:10.3177/jnsv.61.S89
- Xu, H., Li, H., Woo, S. L., Kim, S. M., Shende, V. R., Neuendorff, N., . . . Wu, C. (2014). Myeloid cell-specific disruption of Period1 and Period2 exacerbates diet-induced inflammation and insulin resistance. *J Biol Chem*, 289(23), 16374-16388.
doi:10.1074/jbc.M113.539601
- Xu, K., DiAngelo, J. R., Hughes, M. E., Hogenesch, J. B., & Sehgal, A. (2011). The circadian clock interacts with metabolic physiology to influence reproductive fitness. *Cell Metab*, 13(6), 639-654. doi:10.1016/j.cmet.2011.05.001
- Yan, L., & Okamura, H. (2002). Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 15(7), 1153-1162.
- Yoshida, D., Aoki, N., Tanaka, M., Aoyama, S., & Shibata, S. (2015). The circadian clock controls fluctuations of colonic cell proliferation during the light/dark cycle via feeding behavior in mice. *Chronobiol Int*, 32(8), 1145-1155.
doi:10.3109/07420528.2015.1065415

Producción Científica

Publicaciones en Revistas con Referato

- **Bibiana Barrios**, Natalia S. Baez, Della Reynolds, Pablo Iribarren, Hugo Cejas, Howard A. Young and Maria Cecilia Rodriguez-Galan. “*Abrogation of TNF α production during cancer immunotherapy is crucial for suppressing side effects due to the systemic expression of IL-12*”. Plos One. DOI: 0.1371/journal.pone.0090116.
- Franco Nicolas Nazar, **Bibiana E Barrios**, Pete Kaiser, Raul H Marin, Silvia Graciela Correa. “*Immune neuroendocrine phenotypes in Coturnix coturnix: do avian species show LEWIS/FISCHER-like profiles?*”. Plos One. DOI:10.1371/journal.pone.0120712.
- Sena AA, Pedrotti LP, **Barrios BE**, Cejas H, Balderramo D, Diller A, Correa SG. “*Lack of TNFRI signalling enhances annexin A1 biological activity in intestinal inflammation*”. Biochemical Pharmacology. DOI:10.1016/j.bcp.2015.09.009.
- Pedrotti LP, **Barrios BE**, Maccio-Maretto L, Bento AF, Sena AA, Rodriguez-Galán MC, Calixto JB, Correa SG. “*Systemic IL-12 burst expands intestinal T lymphocyte subsets bearing the $\alpha_4\beta_7$ integrin in mice*”. European Journal of Immunology. DOI: 10.1002/eji.201545585.
- A. Aldana, **B. Barrios**, M. Strumia, S. Correa, M. Martinelli. “*Dendronization of chitosan films: surface characterization and biological activity*”. Reactive and Functional Polymers. Volume 100, pages 18–25. 2016.
- Marina de Paula-Silva, **Bibiana Elisabet Barrios**, Lisa Macció Maretto, Angela Aparecida Sena, Sandra Helena Poliselli Farsky, Silvia Graciela Correa, Sonia Maria Oliani. “*Role of the protein annexin A1 on the efficacy of anti-TNF treatment in a murine model of acute colitis*”. Biochemical Pharmacology. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.06.012.