

Tesis de Posgrado

Acción de los glucocorticoides y la insulina en el sistema inmune

Castillo, Marta Beatriz

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Castillo, Marta Beatriz. (1985). Acción de los glucocorticoides y la insulina en el sistema inmune. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1903_Castillo.pdf

Cita tipo Chicago:

Castillo, Marta Beatriz. "Acción de los glucocorticoides y la insulina en el sistema inmune". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1903_Castillo.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES
Y LA INSULINA EN EL SISTEMA INMUNE**

por
Lic. Marta Beatriz Castillo

**Tesis presentada para optar al título
de Doctor en Ciencias Químicas**

Directora de Tesis: Dra. Alicia Roldán

1985

Instituto de Biología y Medicina Experimental
Obligado 2490, 1428 Buenos Aires, Argentina

1903
ej. 2

A mis padres

A Leo

A mi hijo

"... Hay que tener perseverancia y, sobre todo confianza en sí mismo. Hay que creer que se está dotado para alguna cosa y que esta cosa hay que obtenerla cueste lo que cueste. Acaso todo saldrá bien en el momento en que menos lo esperemos".

María Curie. 1894.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco especialmente a la Dra. Alicia Roldán, mi directora de tesis, por el aporte de sus conocimientos y por el apoyo y estímulo demostrado a lo largo de estos años.

Al Dr. Héctor Carminatti y al Dr. Carlos Lantos por haberme apoyado y estimulado en mis primeros pasos en la investigación científica.

A la Lic. Cristina M. Rondinone y a la Sra. Roxana Schilacci por su colaboración en la parte experimental de este trabajo, además de su cooperación y amistad.

A la Dra. Lía Rumi, al Dr. Israel Algranatti, a las Licenciadas Marta García y Alejandra Chasseing, por su asesoramiento en la realización de los cultivos de linfocitos.

Al Dr. Juan Carlos Cresto por la preparación y donación de la insulina radioactiva, así como su valiosa discusión sobre los trabajos de insulina.

A la Dra. Belinda Masa del Hospital Pedro Elizalde por entregarme semanalmente muestras de sangre de los dadores voluntarios, y a todos los miembros del Instituto de Biología y Medicina Experimental que generosamente donaron sangre para la realización de los trabajos con linfocitos.

A las bibliotecarias Lic. María T. di Vietro, Srta. María Laura Pisano y Sra. Cristina Vega de Coirini por su valiosa colaboración bibliográfica.

A César A.T.Jaimes por la realización de los gráficos.

A la Sra. Cristina Vega de Coirini por su asesoramiento para la transcripción de este manuscrito.

Al Dr. Virgilio Foglia y a todo el personal del Instituto de Biología y Medicina Experimental por el clima de colaboración y amistad en que se desarrollan las tareas.

I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION GENERAL	1
I. Historia del conocimiento de la función del timo.	2
II. Morfología y función del timo.	3
III. Maduración y función de los linfocitos.	5
IV. Glucocorticoides y células linfoides.	8
IV.1. Glucocorticoides y timo.	10
IV.2. Glucocorticoides y linfocitos.	12
V. Diabetes Mellitus: sus alteraciones metabólicas y endócrinas.	15
VI. Diabetes e inmunidad.	18
VII. Mecanismo de acción de la insulina.	21
VIII. Insulina y células linfoides.	22
OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO	25
CAPITULO I: EFECTO DE LA DIABETES POR ESTREPTO- ZOTOCINA SOBRE EL TIMO DE RATAS NOR- MALES Y ADRENOPRIVAS.	26
I.1. Introducción	27
I.2. Materiales y Métodos	32
I.2.1. Drogas y soluciones	32
I.2.2. Animales de experimentación	32
I.2.3. Extracción de timocitos	34

I.2.4. Fraccionamiento de timocitos.	34
I.3. Resultados.	36
I.4. Discusión.	44
CAPITULO II: ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE	
EL TIMO DE RATAS ADRENOPRIVAS Y	
ADRENOPRIVA Y ADRENOPRIVA-DIABETICA	
	46
II.1. Introducción.	47
II.2. Materiales y Métodos.	50
II.2.1. Drogas y soluciones.	50
II.2.2. Animales de experimentación.	50
II.2.3. Preparación e incubación de la suspensión celular.	51
II.2.4. Determinación de la unión de Dex- ³ H en timocitos enteros de ratas.	52
II.2.5. Métodos estadísticos.	53
II.3. Resultados.	54
II.3.1. Estudio de receptores de Dex- ³ H en timo- citos enteros de ratas Ax y AxD.	54
II.3.2. Efecto de los GC sobre la incorporación de uridina- ³ H en timocitos de ratas Ax y AxD.	60
II.4. Discusión.	63

CAPITULO III: ACCION DE LA INSULINA SOBRE EL TIMO DE RATAS ADRENOPRIVAS Y ADRENOPRIVA-DIABETICAS	66
III.1 Introducción.	67
III.2. Materiales y Métodos.	71
III.2.1 Drogas y soluciones.	71
III.2.2 Animales de experimentación.	72
III.2.3 Preparación de las células e incubación con AIB.	72
III.2.4 Estudio de receptores de insulina en timocitos.	73
III.3. Resultados.	75
III.3.1 Estudio de transporte de AIB en timocitos.	75
III.3.2 Estudio de receptores de insulina en timocitos.	82
III.4. Discusión.	86
CAPITULO IV: ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES Y LA INSULINA EN LOS LINFOCITOS HUMANOS ESTIMULADOS	88
IV.1. Introducción.	89
IV.2. Materiales y Métodos.	92
IV.2.1 Drogas y soluciones.	92
IV.2.2 Extracción y purificación de células mononucleares.	93

IV.2.3. Activación de las células con mitógenos.	94
IV.2.4. Determinación de la síntesis de ADN.	94
IV.2.5. Hormonas.	95
IV.2.6. Ayuno de los linfocitos.	96
IV.2.7. Degradación de la insulina- ¹²⁵ I.	96
IV.3. Resultados.	98
IV.3.1. Efecto de los glucocorticoides sobre los linfocitos estimulados.	98
IV.3.2. Efecto de la insulina sobre los linfocitos estimulados.	103
IV.3.3. Acción conjunta de los glucocorticoides y la insulina sobre los linfocitos estimulados.	113
IV.4. Discusión.	122
SUMARIO Y CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFIA	136

ABREVIATURAS

Ac	anticuerpo
ADN	ácido desoxirribonucleico
AE	actividad específica
Ag	antígeno
AIB	ácido α -aminoisobutírico
ARN	ácido ribonucleico
Ax	adrenopriva
AxD	adrenopriva-diabética
B	corticosterona: 11 β , 21 dihidroxi-4-pregnen-3,20 diona
B1/B2/B3	banda 1 / banda 2 / banda 3
BSA	albúmina sérica bovina
C	control
^{14}C	carbono catorce
cel	células
Ci	Curie
Con A	Concanavalina A
cpm	cuentas por minuto
D	diabética
Dex	dexametasona: 9 α -fluor-11 β , 17 α , 21 trihidroxi-16 α metil- Δ 1, Δ 4 pregnen-3,20 diona
E ₂	estradiol
F	cortisol: 11 β , 17 α , 21 triol-4 pregnen-3,20 diona
FCS	suero fetal bovino
f mol	femtomol
g	aceleración de la gravedad
GC	glucocorticoide

GC-R	glucocorticoide-resistente
GC-S	glucocorticoide-sensible
GH	hormona de crecimiento
^3H	tritio
H-R	hormona-receptor
hs	horas
^{125}I	iodo ciento veinticinco
IL-1	interleuquina-1
IL-2	interleuquina-2
In	insulina
K_d	constante de disociación
LB	linfocito B
LT	linfocito T
M	molar
mARN	ácido ribonucleico mensajero
MEM	Minimal Essential Medium
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
N	normal
Nc	nicotinamida
P	progesterona
PBS	buffer fosfato salino
PCA	ácido perclórico
pg	picogramo
PHA	fitohemaglutinina
RPMI	RPMI medium 1640

Stz	estreptozotocina
T	testosterona
TCA	ácido tricloroacético
Tris	hidroximetil-aminometano
uCi	microCurie
U.I.	unidades internacionales
ul	microlitro
U/L	unido versus libre
vol	volumen

I N T R O D U C C I O N G E N E R A L

I. Historia del conocimiento de la función del timo

La importancia inmunológica del timo y de sus células está actualmente bien establecida. En realidad durante centurias el timo ha sido un órgano enigmático y se han producido muchas controversias sobre su embriología, anatomía, fisiología, patología y significado clínico.

Los antiguos griegos, quienes realizaban sacrificios rituales en animales jóvenes y generalmente prepúberes, notaron la existencia de una masa de tejido en el pecho sobre el corazón, extendiéndose hasta el cuello, y concluyeron que este debería ser el asiento del "alma". La anatomía indica que el timo involuciona en el adulto y finalmente se convierte en delgadas tiras o fragmentos de tejido fibrograso conteniendo unos pocos islotes linfocitarios.

Un gran número de trabajos sobre el tema han sido publicados y compendiados por Miller (1). John Beard, a comienzos de siglo, concluyó por observaciones histológicas que el timo debería ser el lugar de origen de aquellas células encontradas en la corriente sanguínea y otras partes del cuerpo. Hammar, en la misma época, a través de estudios de embriología y microanatomía, consideró que tenía "función antitóxica"; finalmente en 1960 se estableció firmemente la función linfopoyética del timo, en parte como resultado de las investigaciones de Metcalf.

Aunque en la década del 60 había quedado establecida la función linfopoyética del timo, los inmunólogos todavía se oponían a la idea de que el timo o sus linfocitos jugaran algún rol en la inmunidad. Una de las causas de esa idea era que los animales timectomizados durante o después de la pubertad podían producir anticuerpos y todo tipo de reacciones de defensa (2). Esto sugería que el timo, al menos en el animal adulto, no participaría en el control y mantenimiento de las defensas del organismo y aún podría no ser un órgano esencial. Los estudios de la atrofia del timo no se realizaron hasta la década del 60; como resultado de ellos, se llegó a la conclusión de que la timectomía del recién nacido, en contraste con la del adulto, estaba asociada con severos disturbios en el desarrollo y funciones del sistema linfoide (3).

II. Morfología y función del timo

El timo es una estructura bilobulada que se encuentra en el mediastino anterior, el cual aunque es necesario para el normal desarrollo de las funciones inmunes (1,3), experimenta una atrofia progresiva después de la pubertad (4-7). Cada lóbulo del timo se puede dividir en tres regiones, de acuerdo a la distribución de los vasos sanguíneos y al número de

células linfoides por superficie: la corteza con gran número de células linfoides; la médula relativamente rica en células epiteliales y menor cantidad de células linfoides, y una región intermedia, la zona cortico-medular, rica en vasos sanguíneos (8).

En la corteza las células linfoides están dentro de un retículo epitelial; la región externa de la misma está compuesta principalmente por linfocitos grandes, células inmunológicamente inmaduras, mientras que la región interna contiene linfocitos pequeños maduros. Además de las células linfoides en la corteza se observan células con actividad fagocítica (macrófagos).

En la médula, las células epiteliales del retículo son de dos tipos distintos, epitelio-reticulares y epitelio-vacuoladas, encontrándose dentro de este retículo linfocitos pequeños que se asemejan a los de la corteza interna; además de células con función macrofágica llamadas "interdigitating cells" y algunos macrófagos (9). Dentro de la médula se encuentran además racimos de células epiteliales, llamados corpúsculos de Hassall (10), que están constituidos por células epiteliales dispuestos en forma concéntrica cuya función se desconoce.

El principal cambio morfológico observado en el timo con la edad, es una depleción de los linfocitos corticales y su reemplazo por células adiposas y un incremento aparente de las células epiteliales y macrófagos de la médula. Esto está

acompañado de una disminución progresiva en peso y volumen del órgano (8).

Según Baroni y col (11) en el timo del individuo adulto predominan los linfocitos OK T3⁺ (timocitos maduros y medulares) (12) y están disminuidas las células OK T6⁺ (timocitos inmaduros y corticales), presentándose en los niños la relación inversa, correspondiendo a una mayor respuesta mitogénica en las células en el primer caso respecto del segundo.

La principal función inmunológica del timo es que en él los timocitos precursores inmaduros proliferan y se diferencian en linfocitos T maduros e inmunocompetentes (13,14). La otra función sería la de segregar una variedad de factores humorales entre los que se encuentran las timosinas (15-17).

III. Maduración y función de los linfocitos

La respuesta inmune comprende una serie de fenómenos que resultan de la interacción específica de las células del sistema inmunológico con el antígeno (Ag). En ella están comprometidos diferentes tipos celulares y mediadores químicos elaborados por las mismas células, que dan lugar a reacciones de carácter humoral o de tipo celular (18).

Dos tipos principales de células intervienen en la respuesta inmune, según los factores que intervienen en su madu-

ración. En primer lugar, células inmunocompetentes sensibles al antígeno, que son las que reconocen específicamente las determinantes antigénicas y que responden de dos maneras: con la formación de anticuerpos humorales (linfocitos B) o de mediadores químicos de la inmunidad celular (linfocitos T). En segundo lugar están las células que tienen un papel accesorio en la respuesta inmune, que facilitan el procesamiento o la presentación del antígeno, o que liberan factores que modifican las manifestaciones de la respuesta inmunológica (18,19).

Las células progenitoras de los elementos inmunocompetentes son llamadas células precursoras o células madres ("stem cells") que son elementos muy indiferenciados, con gran capacidad proliferativa, de autorenovación y de diferenciación en formas más maduras (19,20).

La maduración de las "stem cells" está dirigida por lo menos en dos direcciones a fin de que las funciones de inmunidad humoral y celular sean posibles. Dicha maduración se produce en los órganos linfáticos primarios: timo y bursa de Fabricio en las aves o su equivalente en los mamíferos (placas de Peyer, apéndice, médula ósea o cualquier cúmulo linfático timo independiente) (21-23).

Cuando la célula precursora migra al timo, se divide y diferencia en timocito inmaduro, después de permanecer un tiempo en la corteza pasa a la médula (24), donde continúa su proceso de maduración inmunológica, que consiste en adquirir

nuevas características y funciones, apareciendo en su membrana una serie de marcadores y receptores que los distinguen, convirtiéndose en linfocitos T (LT) (20,25,26). Una vez completada esta etapa de maduración los linfocitos migran hacia los órganos periféricos donde se alojan (órganos timo dependientes: zona paracortical de los ganglios, anillo que rodea la arteriola central de la pulpa blanca del bazo y zona que circunda los centros germinativos de los folículos linfáticos de los ganglios (20), quedando parte de ellos en la sangre o en la linfa formando el "pool" de linfocitos recirculantes, no participando el timo en la recirculación.

Las funciones de inmunidad celular del linfocito T son: hipersensibilidad tardía, rechazo de injertos, reacción injerto contra huésped y defensa contra organismos intracelulares (27)

Para simplificar, las funciones del linfocito T se podrían clasificar en dos grandes grupos: efectoras y reguladoras. Las primeras comprenden producción de factores que intervienen en la inmunidad mediada por células (18) y la capacidad de ejercer citotoxicidad directa. Las segundas, que pueden actuar sobre el linfocito T o B pueden ser o no específicas para el Ag; existen así linfocitos T colaboradores, amplificadores y supresores (28,29). En general puede decirse que casi todas las funciones estudiadas parecerían ser ejercidas por poblaciones diferentes, que ya están precomprometidas para esa función, aún antes del contacto con el Ag.

Las "stem cells" provenientes de la médula ósea que pasan por el órgano equivalente a la bursa de Fabricio (19,22), maduran y adquieren nuevas características y funciones que los convierten en linfocitos B (LB). Estos linfocitos B pasan a formar parte del tejido linfático periférico (área timo independiente: folículos linfáticos subepiteliales, zona medular de los ganglios, pulpa blanca del bazo y centros germinativos de los ganglios) y de la sangre, donde forman el "pool" de linfocitos circulantes (18).

La última etapa de maduración se cumple a partir del contacto con el Ag y/o por alguna otra señal estimuladora (30). Si así sucede el linfocito B se transforma en una célula plasmática productora de inmunoglobulinas con actividad anticuerpo específico, o sea que la función del linfocito B está relacionada con la producción de anticuerpos humorales (27).

IV. Glucocorticoides y células linfoides

Las hormonas glucocorticoides (GC) tienen marcados efectos farmacológicos sobre las células del sistema linfoide. Estos efectos son la base del amplio uso de estas hormonas en el tratamiento de una variedad de enfermedades que involucran procesos inmunológicos, inflamatorios y neoplásicos (31,32). Pero

a pesar de ser universalmente usados desde hace cuatro décadas, muy poco es lo que se sabe sobre su mecanismo de acción.

Durante las dos últimas décadas se ha acumulado bastante evidencia sobre la respuesta "in vivo" e "in vitro" de células linfoides animales y humanas a los glucocorticoides. Estos estudios, básicamente en roedores, dieron información importante sobre los primeros pasos de la acción glucocorticoidea, enfatizando el rol central de receptores específicos para glucocorticoides en células "target" linfoides no humanas.

Se sabe que en una especie dada o en líneas celulares en cultivo, las células linfoides no son uniformemente susceptibles a la acción de los glucocorticoides. Se ha demostrado la aparición de clones cortico-resistentes en la línea celular del linfoma S49 1A (33) y en el linfosarcoma P1798 (34,35). Además, en una misma línea celular ocurren cambios durante el desarrollo en la sensibilidad a dichas hormonas, que parecen seguir un modelo alternativo de resistencia y sensibilidad. Se desconoce por el momento las bases moleculares de estas variaciones.

Algunos autores han postulado que esta resistencia a los glucocorticoides podría estar asociada con una disminución en el número de sitios receptores a los glucocorticoides (33), aunque este concepto es actualmente discutible pues se ha demostrado que algunas células glucocorticoides resistentes poseen receptores como las sensibles (36).

IV.1. Glucocorticoides y timo

Selye (37) fue el primero en demostrar la involución del timo en ratas luego de la administración de extractos adrenocorticales. Ingle (38) encontró que una moderada involución del timo se podía producir agregando grandes cantidades de "cortina" en el agua de bebida de ratas enteras.

Houssay y col (39), Jaffe (40) y Rapela (41), corroboraron lo señalado primeramente por Boinet en 1899 (42), quien encontró un aumento del tamaño del timo de la rata luego de la adrenalectomía, estando este aumento asociado a un incremento en el número de células (43).

Dougherty y White en 1943 (44) encontraron que los glucocorticoides producían involución del tejido linfoide y a partir de 1950 se hizo general la idea de que estas hormonas afectan las respuestas inmunológicas (45).

La involución del timo por la inyección de glucocorticoides lleva a la desaparición de casi el 95% de timocitos por acción citolítica en los roedores (46) y disminución de 70 a 90% en la síntesis de proteínas (47). Parece sin embargo que una pequeña población de células (5%), marcadamente enriquecida en células T maduras, persiste en el timo a pesar de repetidos tratamientos con altas dosis de hidrocortisona y por consiguiente se los considera células glucocorticoides-resistentes (48).

La acción timolítica de los glucocorticoides no es ejercida al azar sobre todas las células del timo. Hay una selectiva destrucción, siendo la corteza (células de corta vida media) sensible a los glucocorticoides, mientras que la médula (células de larga vida media) no lo es (43,49).

Las acciones de los glucocorticoides sobre los timocitos de ratas han sido ampliamente investigadas. Los efectos metabólicos de los glucocorticoides son numerosos e incluyen la inhibición de la entrada y del transporte de glucosa y otras hexosas (50-54), de la síntesis de proteínas (50,55-59), de la incorporación de precursores a ADN y ARN (55,56,60,61), del transporte de α -AIB y otras sustancias (56,62-64), además de la rápida estimulación de la ARN polimerasa B ADN-dependiente (65,66) y de la alteración en el metabolismo de los ácidos grasos (67,68). Además de estos efectos los glucocorticoides producen cambios morfológicos (reducción del tamaño de las células) que conducen a la lisis celular (69-72) e incluyen alteraciones de la cromatina y aumento de la fragilidad nuclear (fragmentación del ADN) (73-76).

El mecanismo general de acción de los glucocorticoides se puede resumir de la siguiente manera: la hormona, que se piensa penetra más o menos libremente en todas las células, forma un complejo hormona-receptor en el citoplasma de las células, que luego es traslocado al núcleo. En el núcleo, aparentemente a través de la regulación de la transcripción, estimula

la síntesis de un mRNA del que resulta la síntesis de una proteína que media los efectos hormonales cuyo efecto final sería la lisis celular (77-79).

IV.2. Glucocorticoides y linfocitos

Durante muchos años se pensó que la marcada linfopenia y monocitopenia producida en el hombre por la administración de glucocorticoides se debía a un efecto citolítico semejante al observado en timocitos.

Actualmente se ha demostrado, entre otros por Fauci y col (80-83), que el efecto leucopénico no es debido a la lisis celular sino a la redistribución de los linfocitos circulantes en ganglios y bazo, ya que desaparece a las 24 hs de administrado el glucocorticoide. Por otra parte se ha demostrado "in vitro" que la presencia de glucocorticoides en cultivos de linfocitos humanos no produce lisis celular después de 24 hs y aún hasta 7 días de cultivo (84,85).

Los glucocorticoides administrados exógenamente no deprimen todos los componentes del sistema inmune uniformemente (81); aparentemente las funciones inmunes mediadas por células serían más sensibles a la supresión por glucocorticoides que la producción de anticuerpos humorales (86,87), produciéndose

una depleción selectiva de los linfocitos T "helper" (células OK T4⁺).

Como está demostrado los glucocorticoides en el hombre (84) inhiben la incorporación de nucleósidos "in vitro" tanto en células B como en células T sin activar. La incorporación de uridina-³H parece ser más sensible a la acción de dichos esteroides en linfocitos B que en T, mientras que la situación es opuesta para la incorporación de timidina-³H (84).

Está generalmente aceptado que la respuesta al estímulo por el mitógeno PHA es una propiedad del linfocito T (88). Cuando los linfocitos son activados se inicia casi inmediatamente una cascada de eventos intracelulares que conduce a la aparición de nuevas funciones o al incremento de algunas (89). La activación de los linfocitos está asociada no solamente a cambios morfológicos (agrandamiento del núcleo y citoplasma con aumento del contenido ribosómico) llamado "transformación blástica" sino también diversos cambios del metabolismo celular. Dichos cambios se caracterizan por alteraciones en el nivel de nucleótidos cíclicos (90), de actividades enzimáticas (91) y por un incremento temprano de la síntesis de ARN y proteínas seguido por la síntesis de ADN y mitosis (92-94).

Estudios "in vitro" han sugerido que muchas funciones de los linfocitos circulantes estimulados son inhibidas, al igual que en el timo, por los glucocorticoides (95-101), además de inhibir la producción de una variedad de interleuquinas (102,103).

La acción de los glucocorticoides puede variar de acuerdo al grado de maduración inmunológica o diferenciación, o al estado de proliferación de las células (104).

Como ha sido demostrado en otros tejidos los glucocorticoides ejercen su acción a través de receptores específicos. Lippman y col (105), Smith y col (106) y Crabtree y col (107) estudiaron receptores de glucocorticoides en linfocitos humanos y el efecto de la mitogénesis con PHA sobre los mismos. Estos autores encontraron que luego de 16 a 18 hs de incubar los linfocitos con el mitógeno, se produce un incremento en el número de receptores por célula. Tanto los inhibidores de la síntesis de ARN (actinomicina D) como de proteínas (cicloheximida) pueden bloquear totalmente esta inducción, sugiriendo que este aumento representa la inducción de los receptores proteicos por el mitógeno. Lippman además examinó la relación entre efecto biológico de los glucocorticoides y la unión al receptor (105,108). Tanto la hidrocortisona como la dexametasona inhibieron dramáticamente la estimulación mediada por la PHA de la incorporación de timidina-³H. La concentración media efectiva para la dexametasona para inducir la respuesta es aproximadamente de 3×10^{-9} M, una concentración que está de acuerdo con la constante de disociación para el receptor en estas células.

Durante los últimos años se ha confirmado que el conocido efecto inmunosupresor de los glucocorticoides se debería

a que estas hormonas inhiben la producción y en algunos casos la acción de una variedad de interleuquinas. Estas sustancias que son proteínas o péptidos segregados por los leucocitos, comunican a las células del sistema inmune entre sí, estimulándolas a proliferar, a diferenciarse o a manifestar ciertas actividades. Estas sustancias actuarían a corta distancia y en bajas concentraciones. La interleuquina-2 (IL-2), producida por los linfocitos T en respuesta a un estímulo mitogénico o antigénico, es necesaria para la proliferación linfocitaria. Gillis y col (109) y Crabtree y col (110) han demostrado que los glucocorticoides inhiben la producción de este factor en células humanas estimuladas por Con A, siendo sensible a concentraciones fisiológicas de estas hormonas. Estos autores proponen que la acción inhibitoria de los glucocorticoides sobre la blastogénesis de los linfocitos T está relacionada a la inhibición de la producción del factor de crecimiento de la célula T o IL-2.

V. Diabetes Mellitus: sus alteraciones metabólicas y endócrinas

La insulina es una potente hormona polipeptídica segregada por el páncreas (111), que actúa sobre el metabolismo y función de muchos tejidos, y además es esencial para la vida

pues su total ausencia conduce al hombre y algunos animales a la muerte.

La deficiencia de insulina es un hecho patológico común y serio en el hombre. En los animales puede ser producida por pancreatectomía o por la administración de drogas como el aloxano o la estreptozotocina que ocasiona la destrucción selectiva de las células B en los islotes pancreáticos. La constelación de anormalidades causadas por la deficiencia de insulina se denomina Diabetes Mellitus, que se caracteriza por poliuria, polidipsia, pérdida de peso a pesar de la polifagia, hiperglucemia, glucosurea, cetosis, acidosis y coma.

Existen amplias anormalidades bioquímicas pero los defectos fundamentales a los cuales pueden atribuirse las anormalidades son alteraciones metabólicas y endócrinas. Entre las primeras pueden mencionarse: la entrada restringida de glucosa a varios tejidos periféricos y un incremento de la liberación de glucosa a la circulación por el hígado. Dado que se produce un exceso de glucosa extracelular y una deficiencia intracelular de la misma, los requerimientos energéticos en la diabetes sólo pueden satisfacerse utilizando las reservas de proteínas y grasas, alterándose de esta manera el metabolismo de las proteínas y grasas. Las principales anormalidades del metabolismo de las proteínas en la diabetes (112) son un aumento en la velocidad a la cual se catabolizan los aminoácidos a dióxido de carbono y agua y aumento de la gluconeogénesis (transforma-

ción de aminoácidos a hidratos de carbono). Las alteraciones metabólicas de los lípidos en la diabetes (113) consisten en el catabolismo acelerado de los ácidos grasos que lleva a un incremento de su oxidación a cuerpos cetónicos (cetosis diabética) en oposición a la reesterificación de los mismos.

Respecto de las alteraciones endócrinas producidas en la diabetes los estudios de Houssay (114) y Long y Lukens (115) claramente demostraron que la hipófisis y las glándulas adrenales agravan el estado diabético. Las hormonas hipofisarias diabetogénicas son la somatotrofina (116), la adrenocorticotrofina (117) y a veces la prolactina (118), especialmente en ausencia o disminución de la secreción de insulina.

En los animales de experimentación y en el hombre, la hipofisectomía y la adrenalectomía mejoran la diabetes y aumenta la sensibilidad de la insulina.

Los principales efectos diabetogénicos de los glucocorticoides son un incremento en el catabolismo proteico con un aumento de la gluconeogénesis hepática, glucogénesis y cetogénesis hepática incrementadas, y disminución en la utilización periférica de la glucosa(113).

No solamente las hormonas hipofisarias y adrenales están involucradas en la diabetes, sino también el glucagon. A partir de la década del 70 Unger (119) ha sostenido que la diabetes no es la consecuencia exclusiva de la falta de insulina, sino que también el exceso de glucagon induce superproducción

de glucosa además de tener efecto sobre los niveles de cetone-
mia.

VI. Diabetes e inmunidad

Es ampliamente conocido que pacientes con Diabetes Mellitus sufren de inmunodeficiencia que los predisponen a infecciones causadas por bacterias, virus y hongos (120). Aunque la inmunidad humoral parece normal en la mayoría de estos enfermos, se ha demostrado que existen distintos tipos de anormalidades funcionales (chemotaxis, fagocitosis, muerte celular de las bacterias, etc.) en leucocitos polimorfonucleares; por otra parte también se ha observado una menor respuesta linfocitaria a la PHA y la Con A, siendo estos efectos más pronunciados en pacientes en cetoacidosis o pobremente controlados (121-125).

Estudios de la inmunidad mediada por células de tipo retardado han dado resultados conflictivos en pacientes con Diabetes Mellitus (126,127). La inmunidad celular parece ser importante en la defensa del huésped contra ciertas infecciones, especialmente las causadas por hongos y micobacterias (128).

Actualmente se han presentado evidencias que los linfocitos de pacientes diabéticos insulino-dependientes sintetizan menor cantidad de interleuquina-2 que los linfocitos de controles no diabéticos (129) o de pacientes diabéticos no de-

pendientes de insulina, y aparentemente esta alteración no dependería de la gravedad del estado diabético (130).

Por otro lado se ha demostrado que pacientes diabéticos tienen menor número de monocitos circulantes que los controles y que en estos pacientes está disminuida la fagocitosis de *Cándida Albicans*, sugiriendo que los monocitos pueden jugar un rol, aunque mínimo en la disminuida resistencia a las infecciones de los pacientes diabéticos (131).

Buschard y col (132) han sugerido que una menor actividad supresora que produce menor inhibición de los linfocitos agresores, podría estar implicada en la patogénesis de la Diabetes Mellitus insulino-dependiente.

Helderman y Raskin (133) han demostrado en pacientes adultos diabéticos una disminución en el número de receptores para insulina en los linfocitos T activados respecto a individuos controles, sugiriendo que los linfocitos generarían menos receptores para protegerse de los efectos potencialmente peligrosos de la hiperinsulinemia.

Por otra parte en animales con diabetes experimental se observa disminuida la reactividad inmune mediada por células (134); además de que se ha encontrado una disminución en el número absoluto de leucocitos circulantes (en especial linfocitos) y una disminución en las células del bazo, siendo menor la respuesta al estímulo con mitógenos con respecto a los controles (135). La reconstitución inmunológica completa del ani-

mal se logra con tratamiento de insulina exógena (136).

En el caso de los ratones genéticamente diabéticos (db/db) de la cepa C57BL/KS que desarrollan obesidad, elevados niveles de glucemia y altas o normales concentraciones de insulina en sangre, se ha demostrado una alteración de la respuesta inmune "in vivo" caracterizada por una significativa disminución en la habilidad de rechazar injertos de piel alogeneicos, inhibición de la capacidad de generar células citotóxicas e incremento en la respuesta de las células formadoras de placas a eritrocitos de carnero (137). Sin embargo, las células del bazo de estos ratones presentan sólo mínimas alteraciones en la respuesta a mitógenos "in vitro" sugiriendo que la respuesta inmune "in vivo" es influenciada por el estado metabólico de la diabetes, debido posiblemente a una anormal función de las subpoblaciones de linfocitos (137). Al contrario de lo que sucede con los animales diabéticos por droga, la disminución de la respuesta inmune de estos ratones no puede ser revertida por insulina exógena (138).

VII. Mecanismo de acción de la insulina

Una de las dificultades para entender el mecanismo de acción de la insulina es que ejerce diversos efectos sobre las células pero con distinta secuencia en el tiempo. Entre los efectos muy rápidos (de seg a min) se encuentra el que ejerce sobre el transporte de membrana; menos rápidos que ellos (de min a horas) son los que se efectúan sobre la activación de enzimas del citoplasma y la síntesis de proteínas; y por último los lentos o tardíos sobre la síntesis de ADN y ARN que se realizan en horas o días (139-141).

Actualmente se considera que esta hormona actuaría sobre las células blanco a través de receptores que se encuentran en la membrana celular (142,143). Sin embargo todavía está discutida la necesidad o no de un segundo mensajero (144) para que se produzca el efecto biológico pues se ha demostrado la internalización de la hormona en varias células (145,146).

Además de que la insulina regula un amplio espectro de procesos metabólicos, esta hormona estimula el crecimiento y proliferación de una variedad de células somáticas en cultivo, y hay evidencias que sugieren que es también un importante regulador del crecimiento "in vivo".

En células en cultivo, la insulina interactúa sinérgicamente con hormonas y factores de crecimiento para estimular a las células que se encuentran detenidas en la fase G1 a con-

tinuar su ciclo. Además la mayoría de las células requieren su presencia para un crecimiento óptimo en un medio libre de suero suplementado por hormonas (147). Por ejemplo, la adición de insulina a cultivos de fibroblastos 3T3 privados de suero resulta en una respuesta pleiotípica, que se caracteriza por aumento en la entrada de uridina, síntesis de ADN, agregación de polisomas, síntesis de proteínas, aumento de la utilización de glucosa y disminución de la degradación de proteínas (148). Jiménez de Asúa y col (149) y Pledger y col (150) han demostrado que la insulina tiene un efecto estimulador sobre la síntesis macromolecular y sobre el crecimiento de fibroblastos en cultivo; y Hollemberg y Cuatrecasas (151), que la interacción específica de la insulina y el factor de crecimiento epidérmico con los receptores de membrana estimulan la síntesis de ADN y la entrada de aminoácidos en dichas células.

VIII. Insulina y células linfoides

Los estudios de los receptores para insulina comenzaron a realizarse en la década del 70, pero dado que se hacían en hepatocitos, adipocitos y músculo su aplicación en el hombre estaba evidentemente muy limitada.

El estudio de la unión de insulina a las células sanguíneas humanas se pudo realizar recién a partir de 1968, luego

que Boyum (152) describió las técnicas para separar dichas células por centrifugado de gradientes. En 1972, Gavin y col (153) demostraron la presencia de receptores para insulina en linfocitos humanos circulantes; sin embargo, el mismo año, Krug y col (154) observaron que dichas células carecen de receptores para insulina y que estos recién aparecen luego de su activación. Poco después, Schwartz y col (155) aclararon esta contradicción comprobando que las células mononucleares que tienen receptores para insulina son los monocitos y no los linfocitos. Aparentemente en el trabajo de Gavin la población linfocitaria estaba contaminada con monocitos, lo que les permitió concluir erróneamente que los linfocitos circulantes tenían sitios de unión para la insulina. Posteriormente, Beck-Nielsen y col (156) confirmaron que los monocitos circulantes son las células sanguíneas que poseen el mayor número de receptores, aunque los polimorfonucleares y los glóbulos rojos también los posean.

Helderman y Strom (157) han demostrado que la aparición de los sitios de unión para la insulina en linfocitos estimulados necesita de la síntesis de ARN y proteínas y no depende de la síntesis de ADN; en consecuencia es un evento premitótico pues se expresa recién a las 24 hs de activación, antes de evidenciarse la síntesis de ADN. Según dichos autores los receptores aparecen en el linfocito T o en el linfocito B según el mitógeno utilizado (PHA-Con A para el LT y LPS para el LB) (158).

La afinidad del receptor de insulina en el linfocito es similar a la determinada en otros órganos insulino-sensibles como el hígado y adipocitos (159-161).

La presencia de sitios de unión de insulina en todas estas células explicarían una posible acción de esta hormona sobre las células del sistema inmune. Es así que en leucocitos circulantes, en donde no se han separado las distintas poblaciones que los componen, se ha descrito que la insulina aumenta el consumo de glucosa, la producción de lactato y la actividad de la ATPasa (162-164). Por otra parte, en poblaciones aisladas se ha observado un aumento de la velocidad fagocítica por parte de polimorfonucleares (165), una activación del metabolismo de los hidratos de carbono en los monocitos (166), del transporte y oxidación de glucosa, transporte de AIB y producción y oxidación de lactato en linfocitos humanos estimulados (167); en estas células también está aumentada la síntesis de ADN (168), como en las de rata (169) y ratón (170). Por último, en timocitos de rata se ha observado aumento del transporte de AIB y glucosa (171-173).

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Estudiar la acción de los glucocorticoides y la insulina en concentraciones fisiológicas, sobre el timo de la rata y la estimulación mitogénica de linfocitos humanos, con el objeto de demostrar una posible acción reguladora de estas hormonas en la función del sistema inmune. Aclarar posibles alteraciones en dicho sistema por variaciones en los niveles circulantes de estas hormonas.

CAPITULO I

EFFECTO DE LA DIABETES POR ESTREPTOZOTOCINA SOBRE

EL TIMO DE RATAS NORMALES Y ADRENOPRIVAS

I.1. INTRODUCCION

El efecto de los glucocorticoides sobre el timo, tanto "in vivo"(174) como "in vitro" (56), es bien conocido. Durante mucho tiempo se pensó que éstas eran las únicas hormonas que producían la involución tímica en la diabetes (6) y en el ayuno (45).

Por otra parte, el efecto de la insulina sobre estas células es menos conocido aunque se han descrito receptores a dicha hormona en timocitos normales (171) y neoplásicos (175) y hay evidencias que sugieren que esta hormona es necesaria para el crecimiento de tumores tímicos (176) y también en los caminos oxidativos de la glucosa (177).

En el presente capítulo se estudia el efecto de la falta de insulina producida por diabetes experimental en el timo de ratas intactas o adrenalectomizadas.

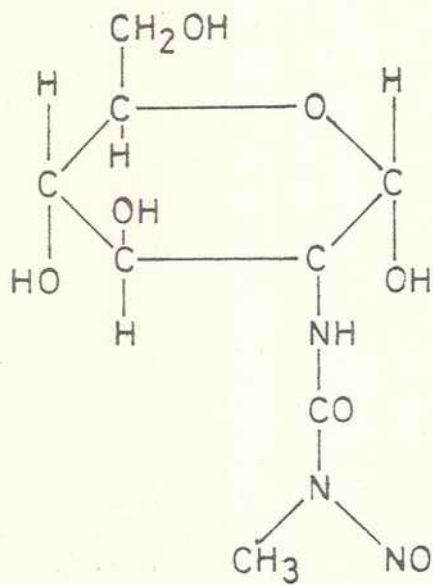
La diabetes puede ser inducida en los animales de experimentación por métodos quirúrgicos, a través de la pancreatectomía o mediante la administración de sustancias tóxicas para las células B de los islotes de Langerhans. En la rata, la pancreatectomía total es difícil de realizar debido a que en esta especie el páncreas se encuentra extendido sobre una gran área en forma difusa; es por ello que en estos animales la diabetes se induce por destrucción de las células B a través de drogas.

De los fármacos citotóxicos, el más utilizado durante mucho tiempo fue el aloxano (2,4,5,6-tetrahidropirimidina), pero su acción altamente tóxica no se limita al páncreas, sino que también afecta al riñón y posiblemente al hígado, adrenales e hipófisis (178). Considerando la baja especificidad y alta toxicidad del aloxano, actualmente se está utilizando la estreptozotocina (Stz) para producir diabetes experimental (179).

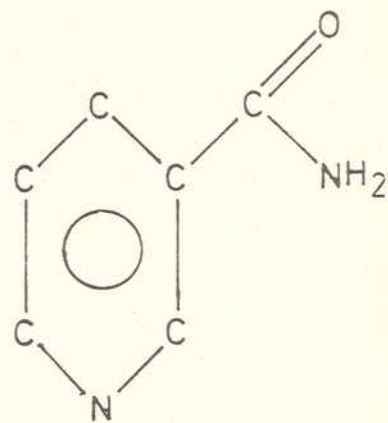
Esta sustancia es un antibiótico de amplio espectro extraído por fermentación del *Streptomyces achromogenes* (180, 181) y preparado en forma altamente purificada. Primero fue descrita como un agente antileucémico (182) y un efectivo carcinógeno (183), utilizándose actualmente en el tratamiento de cáncer de células B en el hombre; Rakieten y col (184) demostraron en 1963 su acción diabetogénica cuando se la administra en forma intravenosa o intramuscular.

Herr y col (181) la describieron como 2-desoxi-2 (3'-metil-3'-nitrosoureido)-D-glucopiranososa (Fig. I.1.) , cuya fórmula empírica es $C_8H_{15}N_3O_7$ y peso molecular 265. La porción glucopiranosica de la molécula se une a los receptores para la glucosa de la célula B y la metil nitrosourea penetra en las células y se une al ácido desoxirribonucleico lesionándolo (185).

Distintos investigadores han demostrado que la administración de Stz, al igual que el aloxano, produce una curva



Estreptozotocina



Nicotinamida

Fig. I.1.: Estructura de la estreptozotocina y la nicotinamida.

trifásica de glucosa en sangre. Entre los 45 y 60 minutos de la inyección, hay una primera fase hiperglucémica que se produce por destrucción de la insulina circulante, alrededor de las 7 horas hay un pico de hipoglucemia debido a que la necrosis de las células B produce la liberación masiva de insulina en sangre; y por último, una vez destruida esta insulina (alrededor de 12 hs) se alcanza un estado hiperglucémico irreversible (186-188). Las células α y el tejido exocrino permanecen normales. En nuestro caso, para evitar que el pico de hipoglucemia produjera incremento en los niveles de GC circulantes (189), las ratas fueron previamente adrenalectomizadas.

La acción diabetogénica de la Stz está en relación directa a la dosis y vía utilizadas (188). En general se considera diabetes leve a los valores de glucemia entre 250 y 320 mg/100 ml, moderada de 300 a 500 y severa por encima de 500 mg/100 ml (190).

Se conocen muchos factores que atenúan o inhiben la diabetes producida por drogas, entre ellos el ácido nicotínico, la nicotinamida y el ácido piridincarboxílico (191). La acción diabetogénica de la Stz en ratas puede ser bloqueada, según Schein y col (192) por una inyección intraperitoneal de 500 mg por kg de peso, de nicotinamida (Fig I.1) 10 min antes del tratamiento con Stz.

El mecanismo por el cual estas drogas son protectoras no es bien conocido; entre las posibilidades discutidas por

Lazarow y col (193) la más probable sería que estos compuestos aumentarían los grupos sulfhidrilos libres en sangre, los cuales a su vez reaccionarían o se combinarían directamente con el aloxano o la estreptozotocina. Schein y col (192,194) han sugerido que la protección ejercida por la nicotinamida está relacionada con el aumento del difosfo-piridin-nucleótido (NAD) dentro de las célulasB y del tejido hepático.

I.2. MATERIALES Y METODOS

I.2.1. Drogas y soluciones

El medio de cultivo utilizado fue Minimal Essential Medium (MEM) obtenido de GIBCO (Grand Island N.Y.). La estreptozotocina fue adquirida en Upjohn Lab. (Inc. Kalamazoo); la albúmina sérica bovina (BSA) fracción V así como la nicotinamida fueron marca Sigma (St. Louis Mo) y el azul trypan fue marca Matheson Coleman and Bell Ohio. Las tiras reactivas Dextrostix fueron de Miles Lab. Argentina.

I.2.2. Animales de experimentación

Se trabajó con ratas ♀ o ♂ de 90 días de la cepa Sprague-Dawley.

Las condiciones del bioterio fueron las siguientes: aire acondicionado a temperatura constante de 25°C e iluminación artificial desde las 6.00 hasta las 20.00 horas. Los animales recibieron dieta balanceada comercial (Purina y Carhill) y agua "ad libitum".

a) Adrenalectomía

Los animales fueron adrenalectomizados por aproximación dorsal en forma bilateral bajo anestesia con éter y usados para experimentación a partir del quinto día de la operación.

Durante ese tiempo fueron mantenidos con alimento comercial y solución salina (ClNa 0,9%) como agua de bebida "ad libitum".

b) Inducción de la diabetes con estreptozotocina

La inducción de la diabetes, tanto en los animales controles como en los adrenalectomizados (Ax) anestesiados con éter, se realizó mediante la administración de una inyección única de Stz en la vena caudal. La dosis empleada fue de 65 mg por kg de peso y se disolvió, momentos antes de ser usada, en solución salina acidificada con ácido cítrico 0,05 M hasta ajustar pH a 4,5, dado que es inestable a la luz, pH neutro y temperatura ambiente (185,187).

En ratas Ax, la inyección de Stz produce alrededor de las 5 hs un pico de hipoglucemia, que puede ser fatal, por carecer dichos animales de glucógeno hepático (195). Para evitarlo, entre las 5 y 10 hs de la administración de la Stz, las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de glucosa 25% (0,5 ml cada 90 min).

Los animales se sacrificaron al décimo día, luego de determinar la glucosa en sangre por tiras reactivas Dextrostix, considerándoselos diabéticos cuando los niveles de glucosa fueron mayores de 250 mg/100ml.

c) Tratamiento con nicotinamida

La protección de los efectos de la Stz sobre los tejidos "target" se realizó en todos los casos mediante la admi-

nistración de una inyección intraperitoneal de nicotinamida 10 min antes de la inyección de Stz. La dosis empleada fue de 500 mg/kg de peso y se disolvió en solución salina.

I.2.3. Extracción de timocitos

Cada timo fue extraído en forma cuidadosa y se le retiraron los nódulos linfáticos y tejido conectivo que podría haber quedado adherido, antes de ser pesados en una balanza Mettler tipo H6. Los timocitos fueron aislados en MEM a 4°C cortando el timo con tijera en trozos muy pequeños. La suspensión obtenida se filtró a través de filtro de nylon de 200 mesh y se centrifugó 5 min a 150 x g. El pellet resultante se resuspendió en un volumen determinado de MEM y las células se contaron en un hemocitómetro Neubauer contra azul trypan (196). La viabilidad no fue nunca menor al 95%.

I.2.4. Fraccionamiento de timocitos

Los timocitos fueron separados sobre gradientes de albúmina sérica bovina (BSA) . Este procedimiento fue una modificación de la técnica de Beller y Unanue (197) y Konda y col (198) del trabajo original de Shortman (199).

La BSA en polvo se disolvió en MEM conteniendo 0,01% de azida sódica como preservador, para obtener soluciones 35, 29,27 y 10%.

Los gradientes preparados en tubos de acetato de nitrocelulosa de 2,5 pulgadas , consistieron en 1 ml de BSA 35% conteniendo 2 a 3 x 10⁸ cel, sobre la cual se pipeteó sucesivamente 1,5 ml de BSA 29%, 1,5 ml de 27% y finalmente 1 ml de 10%. Estos fueron centrifugados en una centrífuga Beckman LS-50 en un rotor 65 a 4.000 g durante 45 min a 4°C. Posteriormente se aspiraron con una pipeta Pasteur las bandas individuales de células de cada gradiente.

La interfase entre 10% y 27% se llamó banda 1 (B1); entre 27% y 29% banda 2 (B2) y entre 29% y 35% banda 3 (B3). Las células del pellet se resuspendieron en 1 ml de MEM. El contenido celular de cada banda y pellet se contó contra azul trypan.

I.3 RESULTADOS

La tabla I.1. muestra que en el animal Ax hay un aumento del peso absoluto del timo con respecto a los controles, que se hace más marcado cuando se relaciona al peso corporal. La administración de Stz en ambos grupos de animales 10 días antes de sacrificarlos, produjo una reducción significativa del peso de timo en los controles como en los Ax.

Como probablemente estas variaciones de peso podrían deberse al número de timocitos contenidos en la glándula, estos se determinaron según materiales y métodos. Como se puede ver en la tabla I.2. los timos de los animales Ax tuvieron 2,6 veces más células que los controles mientras que en las diabéticas, luego de 10 días del tratamiento con Stz, el contenido de timocitos disminuyó 15 veces con respecto a los animales normales. El contenido de células en los timos de ratas AxD fue 5 veces menor que en las Ax.

De esto se concluye que la diabetes por Stz disminuye el número de linfocitos en el timo.

Debido al conocido efecto antileucemiante de la Stz (182), para descartar una posible acción tóxica directa de la droga sobre los timocitos, se decidió dissociar el efecto linfotóxico del diabetogénico. Para ello se protegió las células B del páncreas de la acción necrosante de la Stz con una inyección previa de 500 mg/ kg de nicotinamida según lo descripto

Tabla I.1.: Efecto de la diabetes por estreptozotocina en ratas intactas y adrenalectomizadas.

Animales	Peso corp. (g)	Peso timo (mg)	Peso timo mg/ 100 g peso corp.	glucemia (mg/ 100ml)
C (8)	334 \pm 12	241 \pm 32	71 \pm 2	114 \pm 10
Ax (8)	241 \pm 9	279 \pm 18	130 \pm 6*	102 \pm 10
AxD (9)	217 \pm 9	159 \pm 11	74 \pm 5 ⁺	389 \pm 31
D (5)	264 \pm 15	128 \pm 15	48 \pm 6**	571 \pm 13

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard.

Los números entre paréntesis indican el número de animales.

La glucosa se determinó según la técnica de la glucosa oxidasa.

Diferencia significativa respecto al animal control:

* $p < 0,001$ ** $p < 0,02$

Diferencia significativa respecto al animal Ax: + $p < 0,001$

Tabla I.2.: Número de timocitos en timos de diferentes grupos de animales.

Animales	N°de cel total x 10 ⁻⁷	N°de cel/timo x 10 ⁻⁷	N°de timos
C	110,7	27,7	4
Ax	214,2	71,4	3
AxD	93,6	13,4	7
D	28,5	1,8	16

La estreptozotocina se inyectó 10 días antes de sacrificar los animales y retirar los timos.

en la introducción de este capítulo.

En la tabla I.3. puede observarse que la nicotinamida no alteró el peso del timo ni su contenido en timocitos en las ratas controles o Ax, pero previno las alteraciones producidas por la Stz, manteniéndose en esa forma las características de los timos de animales normales o Ax.

Estos datos prueban que las variaciones observadas en el peso del timo y la disminución del número de timocitos de la rata AxD por Stz sería provocado por la falta de insulina y no por un efecto linfotóxico del antibiótico.

Es generalmente aceptado que la maduración y diferenciación de los timocitos es un proceso gradual acompañado por una igualmente disminución de sensibilidad a los GC (2). La maduración de acuerdo a esta idea llevaría a una variada población intermedia entre timocitos GC sensibles y GC resistentes.

Con el objeto de determinar cuantitativamente en que forma varían estas poblaciones por acción de la adrenalectomía o la diabetes, se resolvió separarlas por gradiente de BSA en cuatro poblaciones distintas. En la tabla I.4. se observa que cuando se estudió la distribución de las células entre las distintas bandas y el pellet, en todos los grupos hubo menor cantidad de células en la B2 y mayor en el pellet. En el gradiente de los animales D no se pudo expresar error dado que para un solo gradiente se necesitaron 16 animales.

Tabla I.3.: Efecto de la nicotinamida sobre el timo de los diferentes grupos de animales.

	Peso timo (mg)	mg timo/ 100g animal	N°cel 10^8 / 100 mg timo
C (5)	269 \pm 23	68 \pm 3	3,40 \pm 0,3
C- Nc (6)	298 \pm 18	70 \pm 4	3,00 \pm 0,4
Ax (7)	360 \pm 22	139 \pm 7	3,55 \pm 0,16
Ax- Nc (4)	343 \pm 42	149 \pm 17	3,86 \pm 0,2
Ax-Stz (7)	235 \pm 21	111 \pm 8	2,96 \pm 0,08
Ax-Stz-Nc (6)	418 \pm 24*	184 \pm 10*	3,66 \pm 0,09*
Stz (8)	116 \pm 5	57 \pm 3	1,89 \pm 0,14
Stz-Nc (4)	286 \pm 14*	131 \pm 11*	2,60 \pm 0,14 ⁺

Los resultados de expresan como promedio \pm error standard.
 Los números entre paréntesis indican el número de animales.
 Diferencias significativas respecto a su control sin Nc.

* $p < 0,001$ + $p < 0,01$

Tabla I.4.: Subpoblaciones de timocitos de gradientes de BSA de timocitos de diferentes grupos de animales.

Banda	C (6)	Ax (6)	AxD (7)	D (1)
1	1,18 \pm 0,14	0,58 \pm 0,08	2,26 \pm 0,25	2,78
2	0,84 \pm 0,15	0,35 \pm 0,12	1,17 \pm 0,22	1,26
3	3,73 \pm 1,06	2,38 \pm 0,51	7,37 \pm 1,96	2,86
P	20,59 \pm 1,49	22,48 \pm 1,45	26,03 \pm 1,86	20,85

Los resultados, que corresponden al número de células $\times 10^{-7}$, se expresan como promedio \pm error standard.

Los valores entre paréntesis indican el número de gradientes de cada grupo.

P = pellet.

Según Konda y col (198) y Beller y Unanue (197) las bandas B1 y B2 contienen células GC-R y la B3 y pellet, GC-S. Para comprobar la sensibilidad de los timocitos a los GC se incubaron juntos las células de B1 y B2 y por separado B3 y pellet, en presencia o ausencia de corticosterona 10^{-6} M, de acuerdo a la técnica que se describe con detalle en el cap.II. Se observó que la incorporación de uridina- 3 H no varió cuando las células de las bandas B1 y B2 se incubaron con GC, mientras que hubo una inhibición de 38% en el caso de las células de B3 y pellet.

Estos resultados confirman que las células de las bandas B1 y B2 son GC-resistentes, mientras que las de B3 y pellet son GC-sensibles.

De acuerdo a esto, la tabla I.5. muestra que la diabetes por Stz disminuye significativamente el número de células GC-sensibles del pellet y aumenta las GC-sensibles de la B3 y las GC-resistentes de B1 y B2, en el animal adrenalectomizado.

Tabla I.5. Distribución porcentual de las subpoblaciones de timocitos de los gradientes de BSA en ratas Ax y AxD.

Banda	Ax (6)	AxD (7)	p
1 (GC-R)	2,3 \pm 0,3	4,5 \pm 0,7	<0,02
2 (GC-R)	1,4 \pm 0,2	3,0 \pm 0,5	<0,02
3 (GC-S)	9,3 \pm 1,9	20,6 \pm 4,5	<0,05
P (GC-S)	87,1 \pm 2,3	71,9 \pm 5,0	<0,02

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard. Los valores entre paréntesis indican el número de gradientes de cada grupo.

Diferencias significativas según el test de Student's entre ratas Ax y AxD.

I.4. DISCUSSION

Los resultados de este capítulo demuestran que la variación de peso observada en las ratas Ax, D, y AxD fue una consecuencia de los cambios en los números de timocitos. Además, es razonable asumir que la involución del timo producida por la Stz fue una consecuencia del estado diabético y no por el antibiótico en sí, como sugirió Nichols (200), dado que la diabetes por Stz al ser prevenida por la acción de la nicotinamida, no produjo cambios en el timo. Por otro lado, resultados preliminares en nuestro laboratorio, indicaron que el peso de timo de la rata Ax se reduce significativamente luego de 7 días de ayuno (201). Además, trabajos recientes de Tabat y col (202) han postulado que las alteraciones del timo en animales diabéticos por Stz estaría relacionado con una disminución en la maduración de los timocitos corticales, culpando de esto a la diabetes sin considerar los elevados niveles de GC circulantes que tienen estos animales (189).

En los cuatro grupos estudiados, la separación de las distintas poblaciones del timo demostró que la disminución del peso del mismo, no se debería a la menor cantidad de timocitos GC-sensibles, sino a una disminución de las células en todas las poblaciones.

Se sabe que la adrenalectomía produce hiperplasia del timo por aumento del número de timocitos GC-sensibles (174),

y que la diabetes lo atrofia por disminución de las mismas células (6,202); estos resultados, según la técnica de gradientes utilizada demuestran esas diferencias , que no llegaron a ser significativas. En el timo de ratas diabéticas se encontró mayor proporción de células GC-resistentes, pero era de esperar obtener menor cantidad de GC-sensibles que las encontradas.

La involución del timo observada en los animales AxD, sugiere que los GC circulantes no son los únicos responsables de la disminución de las células GC-S producidos por la diabetes, como fue considerado por Dougherty y col (45,203) varios años atrás.

Karmali y Horrobin (204) encontraron efectos similares sobre la disminución de peso del timo en ratones distróficos, en los cuales los GC no están involucrados; según ellos el crecimiento lento del timo en estos ratones sería consecuencia de la disminución de los niveles plasmáticos de prolactina y somatotrofina, y quizás otras hormonas.

Nuestros resultados demuestran que la ausencia de insulina y/o las correspondientes alteraciones metabólicas y endócrinas, podrían ser una importante causa en la involución tímica en los animales AxD y D.

CAPITULO II

ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE EL TIMO DE

RATAS ADRENOPRIVAS Y ADRENOPRIVA-DIABETICAS

II.1. INTRODUCCION

De acuerdo a lo observado en el capítulo anterior, los GC y la insulina ejercen un efecto importante sobre las poblaciones del timo. Después de la adrenalectomía, la falta de corticosterona produce aumento del tamaño por incrementar el contenido de timocitos, mientras que la falta de insulina produce una marcada disminución de los mismos, en especial los GC-sensibles.

Dado que las pequeñas diferencias entre subpoblaciones del timo de ratas Ax y AxD no son suficientes para explicar la gran diferencia en los pesos del timo de ambos grupos, se decidió investigar el efecto de los GC en los timocitos de estos animales.

Debido a la conocida acción inhibitoria de los GC sobre la síntesis de ARN (57,78,205), se decidió estudiar la acción de la corticosterona (B) y la dexametasona (Dex) sobre la incorporación de uridina a ARN, así como también los receptores a estas hormonas en timocitos de ratas Ax y AxD; ya que como se trata en la introducción de esta tesis, el mecanismo de acción de los GC es mediado por receptores.

Los GC entran a la célula del timo por mecanismos desconocidos y luego, como otras hormonas esteroides, se unen a receptores proteicos citosólicos con alta afinidad de manera reversible (77,206,207); a 37°C en forma casi instantánea, el

complejo hormona-receptor comienza a aparecer en el núcleo (208). Según Wira y Munck (206) en el timocito el tiempo medio de esta traslocación sería de 30 seg.

El paso limitante de la velocidad de esta traslocación (temperatura sensible), sería una de las etapas iniciales de activación (209), resultando de ello una transformación alostérica en la cual el complejo adquiere alta afinidad por los sitios nucleares (210,211). Los receptores citosólicos no son activados en su totalidad, el grado de esta reacción puede ser el determinante de la cantidad de complejo H-R unido al núcleo (212). Aún no se ha aclarado la naturaleza de los sitios nucleares; estando no solamente el ADN probablemente involucrado en la unión (213), sino también otras partes de la cromatina (214).

Aparentemente la asociación al núcleo del complejo H-R modula de alguna manera la expresión genética (215). Según Munck y col (216-218) existen suficientes evidencias de las que se puede concluir que los efectos inhibitorios de los GC sobre tejido linfoide, así como los efectos generalmente estimulatorios de las hormonas esteroides sobre otros tejidos, están mediados probablemente por la inducción de mRNA específicos. Recientemente, en distintos tejidos incluido el timo, se ha identificado una proteína inhibitoria inducida por los GC (219).

En este capítulo se estudia la unión de la Dex al receptor nuclear ya que se trabajó con timocitos enteros a 37°C. Basándonos en los trabajos realizados por Sibley y Tomkins (35), Schaumburg (220), Munck (221) y otros, primero se verificaron las condiciones experimentales para estudiar los sitios de unión nuclear de la hormona en timocitos de ratas Ax para luego poder compararlos con los de las ratas AxD.

II.2. MATERIALES Y METODOS

II.2.1. Drogas y soluciones

Uridina (5^3H) (AE 25 Ci/mmol), dexametasona ($6,7-^3\text{H N}$) (AE 50 Ci/mmol) y el protosol fueron provistos por New England Nuclear (Boston, M.A.). La estabilidad de la Dex ^3H fue controlada mediante cromatografía contra patrones no radioactivos.

Los esteroides no radioactivos, dexametasona, corticosterona, progesterona, estradiol y testosterona fueron provistos por el Dr. Alejandro De Nicola.

El buffer fosfato salino (PBS) utilizado se detalla a continuación: pH= 7,4-7,5.

ClNa	140	mM
ClK	2,7	mM
PO ₄ H ₂ K	1,5	mM
PO ₄ HNa ₂	8	mM
Cl ₂ Mg.6H ₂ O	0,5	mM
Cl ₂ Ca	0,7	mM

Los demás compuestos utilizados son los descritos en el capítulo I.

II.2.2. Animales de experimentación

Se trabajó con ratas ♀ y ♂ de 90 días de la cepa Sprague-

Dawley de nuestro bioterio. Las ratas Ax y AxD se obtuvieron según lo descrito detalladamente en el capítulo I.

II.2.3. Preparación e incubación de la suspensión celular

La extracción de los timocitos se realizó según la técnica detallada en el capítulo I.

La incubación se realizó de la siguiente manera: 4 ml de suspensión de células se incubaron en MEM ($1,2-1,4 \cdot 10^7$ cel/ml) en Erlenmeyers siliconizados por triplicado, en presencia o ausencia de esteroides durante 3 hs en una atmósfera de 95% O₂ y 5% CO₂ con agitación suave, en un baño termostático modelo Dubnoff.

A las 2 hs y media de incubación se dió un pulso de 0,2 uCi de uridina-³H. Finalizada la incubación las células se trasvasaron a tubos cónicos y se separaron inmediatamente del medio por una centrifugación de 5 min a 100 g a 4°C. Todas las operaciones fueron llevadas a cabo entre 0° y 4°C.

Las células fueron lavadas dos veces con 3 ml de MEM para eliminar la radioactividad no incorporada, y contadas finalmente en un hemocitómetro, siendo la viabilidad mayor del 90% (por exclusión del azul trypan); posteriormente se rompieron con ácido perclórico (PCA) 5% y la fracción ácido soluble se descartó.

La fracción ácido insoluble se disolvió en protosol

y se transfirió a viales de conteo agregando 3 ml de tolueno centellante. La radioactividad se leyó en un contador de centelleo líquido modelo Beckman LS 100 con una eficiencia de 65% para tritio.

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la incorporación de uridina-³H en relación a los controles respecto a 10^7 células.

Los timocitos de ratas Axy AxD fueron procesados el mismo día y en el mismo experimento.

II.2.4. Determinación de la unión de Dex-³H en timocitos enteros de ratas

La determinación de la unión total de Dex-³H se realizó por triplicado incubando 1 ml de suspensión de timocitos en MEM ($3-4 \times 10^7$ cel/ml) en tubos de vidrio siliconizados, en presencia de Dex-³H.

Para determinar la unión no específica se incubaron idénticas alícuotas en presencia de 1000 veces de exceso de Dex no radioactiva. Para obtener la curva completa de saturación se agregaron cantidades crecientes de Dex-³H.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C durante 45 min con agitación suave en una atmósfera de 95% O₂ y 5% CO₂, en un baño termostático.

Al finalizar la incubación las células se enfriaron, se centrifugaron a 4°C durante 5 min a 100 g y lavaron una vez con 5 ml de PBS a 25°C y dos veces con 2 ml del mismo buffer a 4°C, de acuerdo con Sibley y Tomkins (35). El pellet final se resuspendió en 0,2 ml de PBS y se contó en tolueno centelleante conteniendo 30% (v/v) de Triton X-100, en un contador de centelleo líquido.

La unión no específica se obtiene por diferencia entre la unión total de Dex-³H y la unión no específica.

II.2.5. Métodos estadísticos

Para determinar las diferencias estadísticamente significativas se usó el test de Student's considerándose significativas, $p=0,05$ o menor.

II.3. RESULTADOS

II.3.1. Estudio de receptores de Dex-³H en timocitos enteros de ratas Ax y AxD.

La unión específica de Dex-³H a timocitos enteros de ratas Ax aumenta durante los primeros 20 min y luego permanece constante al menos hasta los 60 min en presencia de Dex-³H 5×10^{-8} M, estando de acuerdo estos resultados con los trabajos de Duval y col (36,48), Pfahl y col (222), y Sibley y Tomkins (35) (Fig.II.1.).

En la Fig. II.2. puede observarse que la unión específica de la Dex-³H luego de 40 min de incubación es dependiente de la concentración de la hormona y la saturación se alcanza con 3×10^{-8} M.

En estas condiciones el 0,5% de la radioactividad total se fijó en núcleo, siendo no específico solamente el 40% de la unión total.

Para determinar la especificidad de la Dex por sus receptores se incubaron timocitos con Dex-³H 5×10^{-8} M, y 1,10,100 o 1000 veces más de Dex, corticosterona o progesterona no radioactivas (Fig. II.3.). La unión de Dex-³H en presencia de los distintos competidores se expresó como porcentaje de la unión total, considerando la unión de la Dex-³H en ausencia de hormona no radioactiva como 100%.

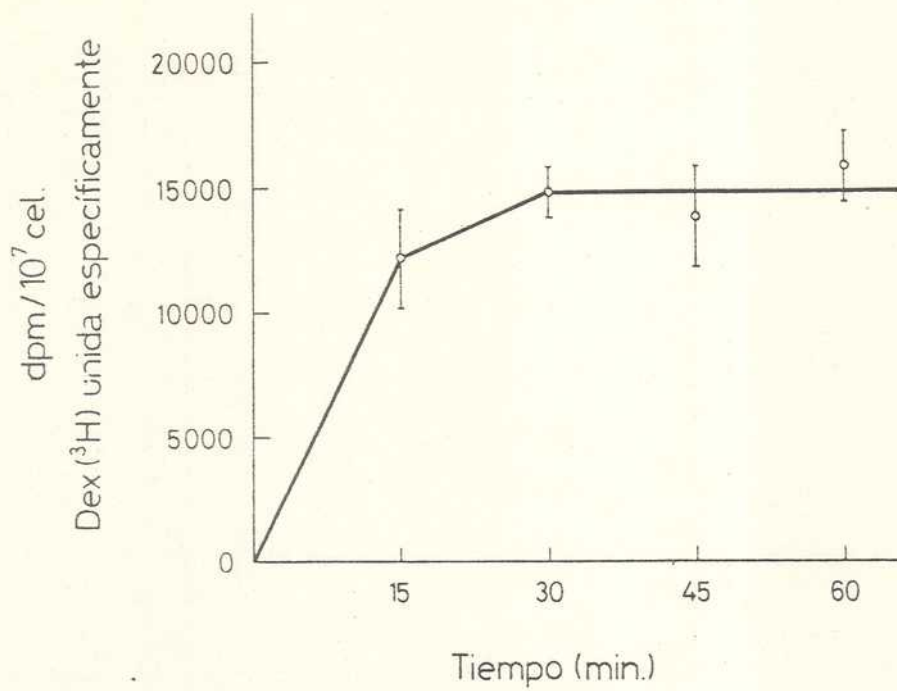


Fig. II. 1.: Unión específica de $5 \times 10^{-8} \text{M}$ de Dex-³H en timocitos de ratas Ax en función del tiempo de incubación a 37°C.

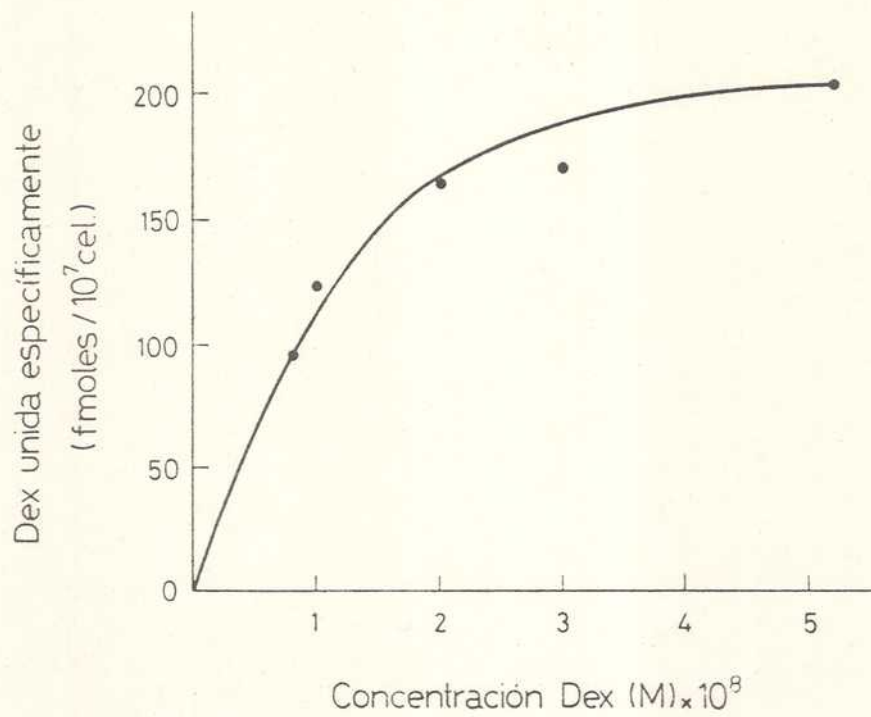


Fig. II.2.: Unión específica de Dex-³H (10^{-8} M a 5×10^{-8} M) luego de 40 minutos de incubación a 37°C, en timocitos de ratas Ax.

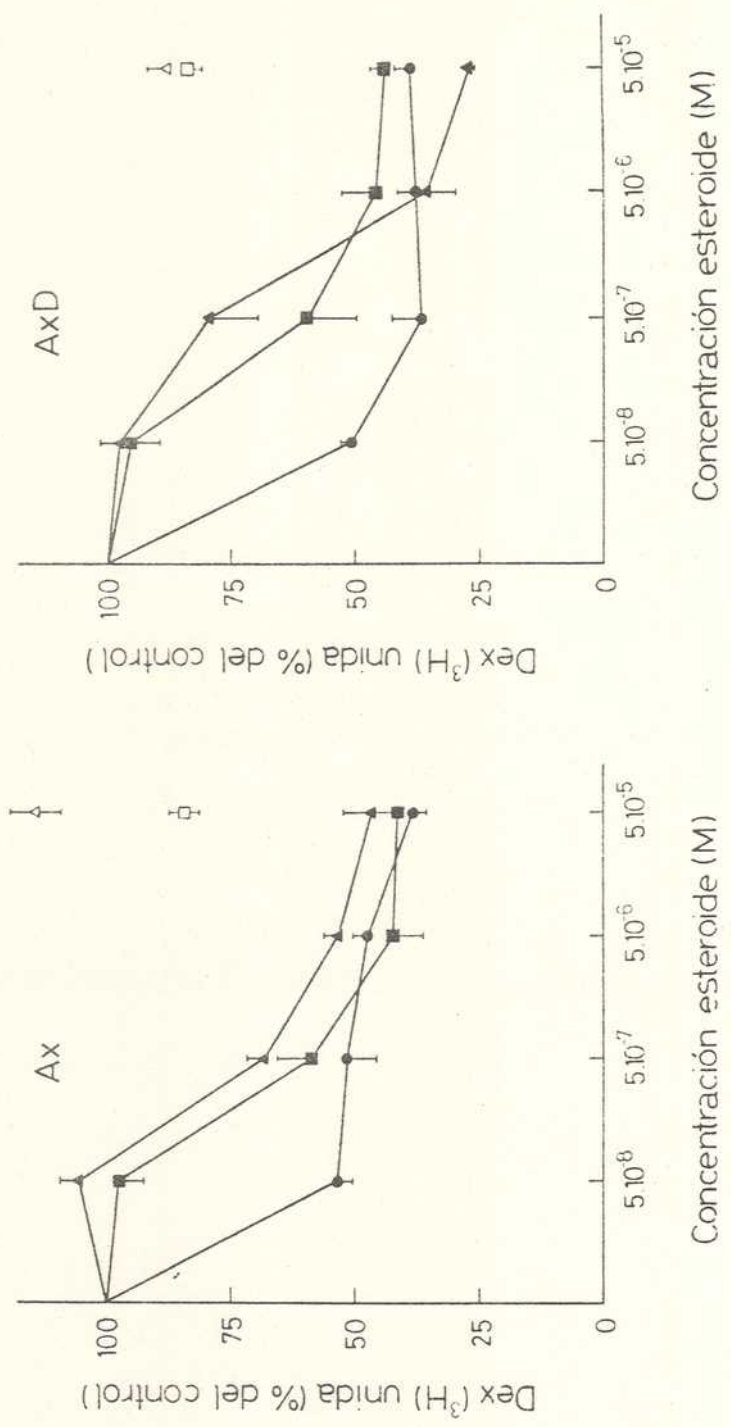


Fig. II.3.: Especificidad de la unión de Dex-³H . Desplazamiento de la unión de Dex-³H por Dex no radioactiva y otras hormonas en timocitos de ratas Ax y AxD.
 (●) Dex, (▲) B, (▲) P, (▲) E₂, (□) T.
 Cada punto representa el promedio ± error standard de tres experimentos por duplicado.

Como se muestra en dicha figura, la afinidad de estos esteroides por los receptores de Dex es similar en ambos grupos de animales, pero difieren en su capacidad para desplazar a la Dex-³H (Dex > B > P). La testosterona o el estradiol en altas concentraciones no desplazaron a la hormona radioactiva. Estos resultados son coincidentes con los descritos por otros autores (36,48,105) tanto en linfocitos humanos como neoplásicos.

Cuando se graficó la relación Dex-³H ligada/libre en función de la hormona ligada, según Scatchard (223) (Fig.II.4.), se obtuvo un gráfico lineal para ambos grupos, lo que corresponde a una sola clase de sitios de unión. Las pendientes correspondientes a cada grupo fueron diferentes ($p < 0,02$), ($K_d \text{ Ax} = 1,77 \pm 0,17 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ y $K_d \text{ AxD} = 3,61 \pm 0,58 \cdot 10^{-8} \text{ M}$), indicando que la afinidad con la que la hormona se une al receptor es distinta, mayor en los timocitos de las ratas Ax que en las AxD.

El número de los sitios de unión en las células de AxD fue 50% mayor que en Ax, no siendo la diferencia significativa debido a la gran dispersión observada en ambos grupos. En Ax 9860 ± 1887 receptores/cel y en AxD 15010 ± 3091 . Los valores de constante de disociación y de receptores en ratas Ax son concordantes con los presentados por Naray y col (207) en timo de rata, entre los tejidos linfoides por ellos estudiados.

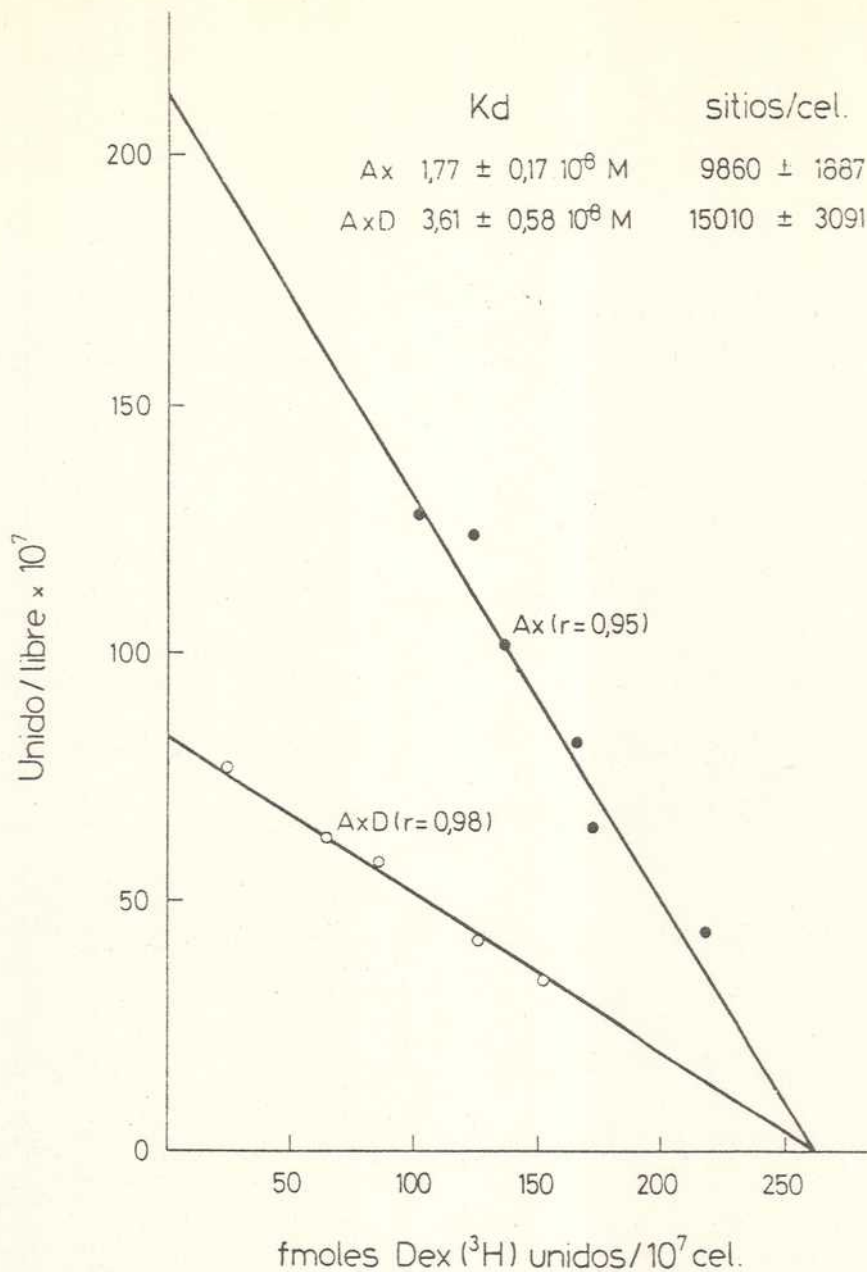


Fig. II.4.: Gráfico de Scatchard de la unión de Dex-³H a timocitos. Cada gráfico corresponde a un experimento representativo de 5 en las ratas Ax (●) y de 3 en las AxD (○). La K_d y los sitios receptores/célula corresponden al promedio \pm error standard de 5 experimentos en ratas Ax y 3 experimentos en AxD, todos hechos por duplicado.

II.3.2. Efecto de los GC sobre la incorporación de uridina-³H en timocitos de ratas Ax y AxD

Para investigar la sensibilidad a los GC de los timocitos de ratas Ax y AxD, se estudió la incorporación de uridina-³H a ARN.

Como se puede ver en la tabla II.1., cuando las incubaciones se realizaron en presencia de Dex 5×10^{-8} M (concentración necesaria para alcanzar la saturación de los receptores) no hubo diferencias significativas en la inhibición de la incorporación de uridina-³H en ambos lotes de animales. Cuando la concentración disminuyó a 10^{-8} M se observó una respuesta errática: en un experimento hubo un menor efecto inhibitorio en los timocitos de ratas AxD respecto a los Ax, mientras que en el otro no hubo diferencias significativas. A la menor dosis ensayada (10^{-9} M) en los tres experimentos se observó una disminución significativa en la inhibición de la incorporación de uridina-³H a la fracción ácido insoluble en timocitos de ratas AxD.

Cuando se usó corticosterona en lugar de Dex, se observó una respuesta similar. En presencia de altas concentraciones de B (10^{-6} M y 10^{-7} M) de cuatro experimentos realizados, dos presentaron una disminución en la inhibición de incorporación de uridina-³H en los timocitos de ratas AxD, mientras que en los otros dos no hubo diferencias. Sin embargo, cuando la

Tabla II.1.: Efecto inhibitorio de la dexametasona (Dex) y la corticosterona (B) sobre la incorporación de uridina-³H a la fracción ácido-insoluble en timocitos de ratas Ax y AxD.

Exp N°	GC	Molaridad	% Inhibición de uridina- ³ H		P
			Ax	AxD	
1	Dex	5 x 10 ⁻⁸	60 ± 3,3	60 ± 1,2	N.S.
6	"	"	52 ± 2,5	52 ± 2,7	N.S.
4	"	"	48 ± 2,5	50 ± 0,6	N.S.
2	"	10 ⁻⁸	27 ± 3,6	33 ± 2,4	N.S.
3	"	"	44 ± 2,0	23 ± 2,2	<0,01
5	"	10 ⁻⁹	16 ± 0,4	+4 ± 4,0	<0,01
1	"	"	21 ± 2,8	11 ± 1,5	<0,05
7	"	"	48 ± 4,6	26 ± 3,7	<0,02
2	B	10 ⁻⁶	36 ± 2,4	31 ± 2,0	N.S.
3	"	"	48 ± 2,6	28 ± 3,0	<0,01
4	"	10 ⁻⁷	28 ± 4,0	27 ± 0,8	N.S.
5	"	"	36 ± 3,0	6 ± 7,0	<0,02
7	"	5 x 10 ⁻⁸	15 ± 2,5	1 ± 5,4	<0,02
8	"	"	47 ± 6,6	12 ± 7,2	<0,05

Cada valor es el promedio ± error standard de triplicados.

concentración de B fue de 5×10^{-8} M se encontró una disminución significativa en el efecto inhibitorio del esteroide en el grupo AxD respecto del Ax.

II.4. DISCUSION

Está generalmente aceptado que la inhibición por GC de la síntesis de ADN y ARN en timocitos está mediada por una proteína inhibitoria (219).

Este mecanismo fue extensamente estudiado , entre otros, por Homo y Munck. Este último sugiere que en las células tímicas de la rata, los complejos cortisol-receptor producen una actividad metabólica proporcional a la velocidad a la cual estos complejos llegan a los sitios nucleares, y no al número de sitios que ellos ocupan (221). Por otro lado, Homo observó que en timocitos fraccionados por gradientes de BSA había una inhibición creciente en la incorporación de uridina desde las células de la banda superior (médula) hacia el pellet (corteza). Sin embargo, estos autores no encontraron diferencias en el número de receptores de GC en las distintas fracciones celulares (205). Estos trabajos sugieren que el número de receptores no siempre se correlaciona con el efecto hormonal o con la traslocación del complejo H-R al núcleo.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que cuando las incubaciones se hicieron con Dex, sólo se encontró diferencia significativa entre timocitos de ratas Ax y AxD a la menor concentración de hormona usada (10^{-9} M), a mayor concentración que la saturación del receptor (5×10^{-8} M) no hubo diferencias entre grupos, encontrándose una respuesta

errática a concentraciones intermedias (10^{-8} M). El mismo mecanismo se encontró con corticosterona pero a mayor concentración, dado que la hormona tiene menor afinidad por el receptor.

El comportamiento errático con Dex 10^{-8} M y B 10^{-6} M y 10^{-7} M se puede relacionar no sólo con la diferencia observada en los pesos de los timos de las ratas AxD sino también a variaciones en las condiciones diabéticas del animal dado que los niveles de glucosa sanguínea oscilaron entre 250 y 580 mg por 100 ml de sangre.

El aumento en la K_d del receptor para su ligando y la menor respuesta biológica hallada a la menor concentración de GC por timocitos de ratas AxD, sugiere una menor sensibilidad a la hormona por estas células.

Un efecto similar se observó en la K_d del receptor citosólico por los GC en hipotálamo de ratas diabéticas (224) y en timocitos de ratones tratados con altas dosis de hidrocortisona (225). Los primeros autores sugieren que dichas alteraciones en la K_d son producidas por la diabetes, mientras que los segundos consideran que es por el predominio de una determinada subpoblación celular.

En el caso de la rata AxD ambas interpretaciones son posibles, aunque es improbable que la misma subpoblación celular que predomina en los animales con altos niveles de GC, y por consiguiente altos niveles de insulina circulante, sea la que se encuentra en las ratas AxD, aunque es posible que en estas

ratas pueda predominar otra subpoblación con las mismas características de las obtenidas por Duval.

Cambios en el número de receptores o en la K_d de una hormona pueden modular la sensibilidad de un tejido a otra hormona. Kahn y col (226) han demostrado que el aumento en los niveles de GC u hormona de crecimiento "in vivo" son capaces de disminuir la sensibilidad de los tejidos a la insulina; y Haring y col (227) que la adrenalectomía produce un aumento significativo de la unión de insulina en adipocitos de rata.

Dado que los animales AxD carecen de GC circulantes, la menor sensibilidad que los timocitos presentan a dichas hormonas se podría deber a alteraciones que se producirían en el receptor por la ausencia de insulina y/o alteraciones hormonales y metabólicas producidas en la diabetes y el ayuno.

En conclusión estos resultados sugerirían que la menor afinidad del receptor de GC por su ligando, observada en las ratas diabéticas sería un mecanismo de defensa del sistema inmune cuando se elevan los niveles de GC circulantes.

CAPITULO III

ACCION DE LA INSULINA SOBRE EL TIMO DE RATAS

ADRENOPRIVAS Y ADRENOPRIVA-DIABETICAS

III.1 INTRODUCCION

En los resultados del capítulo I se observa una disminución de peso del timo en los animales AxD, y del capítulo II una disminución en la sensibilidad a los GC.

Para investigar si estas alteraciones en el timo eran, de acuerdo a lo dicho en la discusión del capítulo anterior, consecuencia directa de la falta de insulina o indirecta por alteraciones metabólicas y/o endócrinas producidas en la diabetes, se estudió en los timocitos la presencia de receptores de insulina y la acción de la hormona sobre el transporte de membrana.

Para ello se estudió el transporte de aminoácidos utilizando el análogo de alanina, α -aminoisobutírico (AIB) (228). Este aminoácido es transportado en diversos tejidos por el sistema A o de alanina, llamado así por ser el sistema preferencial para aminoácidos neutros (229). El AIB tiene la ventaja de no ser metabolizado por la célula debido a que no se incorpora a proteínas ni es catabolizado; por lo que su transporte puede estudiarse independientemente del metabolismo intracelular.

Por otra parte, está demostrado que la insulina estimula el transporte de aminoácidos en una variedad de tejidos (230-233), incluido el tejido linfoide (171,234,235).

El mecanismo de acción de la insulina ha sido difícil de entender dado que sus diversos efectos se producen con distinta secuencia en el tiempo (139-141), como se detalla en la introducción.

Los estudios de los sitios de unión de la insulina en la membrana plasmática ha aumentado notablemente el conocimiento de la forma en que la hormona interactúa con las células, así como el de sus diversos efectos en ella (142,143,236, 237). Se ha demostrado que dicho receptor es una glicoproteína de cuatro subunidades unidas por puentes disulfuro y tiene un peso molecular de 350.000 daltons (238,239). La unión de la insulina a sus receptores es reversible, de alta afinidad, tiempo dependiente y proporcional a la actividad biológica de un grupo de análogos de la insulina. La constante de afinidad (K_a) del receptor para la hormona en diversos tejidos varía entre $10^8 M^{-1}$ y $10^{10} M^{-1}$ (142,236,237).

Probablemente los efectos sobre las funciones de membrana, tales como transporte de azúcares, aminoácidos, iones y precursores de ácidos nucleicos ocurran como consecuencia directa de la unión de la insulina a sus receptores específicos (139-141,240). Además de estos efectos, la insulina regula un número de procesos intracelulares, incluyendo activación de enzimas y síntesis de ADN,ARN y proteínas (139-141).

Hasta ahora ha sido difícil proponer un único mecanismo que explique efectos tan discímiles de esta hormona (241).

Por el momento se consideran dos teorías. Una de ellas es que la insulina genera un segundo mensajero en la capa interna de la membrana celular y que este mensajero lleva a cabo los efectos intracelulares de la hormona; entre los posibles candidatos para esta función se encuentran: iones en especial el calcio (141,242,243), cGMP (244) o disminución de cAMP (245,246). A pesar de que desde hace más de una década se está trabajando esforzadamente para demostrar esta teoría, aún no se ha llegado a resultados definitivos. La otra teoría se basa en que la insulina entraría a la célula y luego ella misma (144) o uno de sus subproductos (247,248) interactúa directamente con estructuras intracelulares.

Lee y Williams (249) fueron los primeros en sugerir la posibilidad de que la insulina entrara en la célula. Ellos observaron que cuando se inyecta insulina-¹²⁵I en la vena porta de las ratas y posteriormente se preparan las fracciones subcelulares de hígado, la hormona se encuentra intacta en las fracciones de núcleo, mitocondria, microsoma y citosol. Estos autores postularon que la hormona no solamente podría entrar a la célula sino también actuar sobre organelas intracelulares tales como el núcleo. Carpentier y col (250) corroboraron esta hipótesis con linfocitos humanos IM-9 al observar que la insulina-¹²⁵I se mueve a través de la membrana plasmática; y Goldfine y col (251,252) con las mismas células demostraron que la hormona puede entrar a la célula intacta y unirse a es-

estructuras como el núcleo. Actualmente se considera que la hormona podría entrar a través de vesículas pinocíticas luego que se une a los receptores de membrana, entrando el complejo H-R, lo que explicaría la pérdida por la célula de sus receptores de superficie (145,146,253).

III.2. MATERIALES Y METODOS

III.2.1. Drogas y soluciones

Acido α -aminoisobutírico ($1\text{-}^{14}\text{C}$) (AE 53 mCi/mmol) de New England Nuclear (Boston M.A.). Insulina- ^{125}I (AE 30-40 uCi por ug) fue preparada y gentilmente donada por el Dr. Juan Carlos Cresto del Hospital Pedro Elizalde.

La insulina para los experimentos "in vivo" fue bovina cristalina de 40 U/ ml y para los experimentos "in vitro" bovina en polvo, ambas de Lilly.

Acido α -aminoisobutírico y tris (hidroximetil) amino metano (Trizma Base o tris) fueron de marca Sigma.

Los buffers utilizados son los que se detallan a continuación:

Buffer Tris I: ClNa 120 mM, ClK 5 mM, Cl₂Ca 1 mM, Cl₂Mg 2,5 mM
PO₄H₂Na 1,5 mM, Tris 25 mM pH 7,7 a 25°C,
glucosa 11 mM.

Buffer Tris II: ClNa 120 mM, ClK 0,5 mM, SO₄Mg 1,2 mM, acetato de Na 1,4 mM, EDTA 1 mM, Tris 50 mM pH 7,3 a 25°C, glucosa 10 mM, BSA 1%.

III.2.2. Animales de experimentación

Se trabajó con ratas de 20 y 90 días. Las ratas Ax y AxD se obtuvieron según lo descrito detalladamente en el capítulo I.

El efecto de la insulina "in vivo" se estudió inyectando 1U de insulina bovina en forma intraperitoneal a cada rata. Los animales se sacrificaron cuando los valores de glucemia estaban entre 50 y 70 mg/100 ml de sangre, determinados por la técnica de la glucosa oxidasa (254).

III.2.3. Preparación de las células e incubación con AIB

La extracción de los timocitos se realizó según la técnica detallada en el capítulo I. Las células se suspendieron en buffer Tris I a temperatura ambiente. Se incubaron 3×10^7 cel/ml en tubos de vidrio siliconizados por triplicado en un baño termostático durante 140 min a 37°C, agregando 30 uM de AIB y 0,2 uCi de AIB-¹⁴C los últimos 20 min.

Cuando se estudió el efecto de la insulina "in vitro" el buffer Tris I contenía 1% de BSA y la insulina se agregó al inicio de la incubación. El efecto de la insulina "in vivo" se determinó incubando timocitos de ratas Ax y AxD que habían sido inyectadas con insulina, comparándose con células de animales no inyectados.

Finalizada la incubación las células se trasvasaron a tubos cónicos y se lavaron con el buffer dos veces. Luego del segundo lavado se contaron contra azul trypan para expresar los resultados por el número de células recuperadas. Posteriormente el pellet final se resuspendió en 0,2 ml de buffer y se extrajo con tritón-tolueno centellante. Los tubos se contaron en un contador de centelleo líquido modelo Beckman LS 100 con una eficiencia de 90% para carbono.

III.2.4. Estudio de receptores de insulina en timocitos

Los timocitos se suspendieron en buffer Tris II. Se contaron las células contra azul trypan y la alícuota de células necesarias para la incubación se centrifugó en tubo cónico, durante 5 min a 100 g a temperatura ambiente. El pellet se suspendió en el buffer Tris II con 1% de BSA.

La incubación se realizó en viales de plástico en un volumen de 0,6 ml por triplicado durante 90 min con agitación. La incubación se realizó a 15°C pues a esta temperatura se mantiene la viabilidad celular, disminuye la degradación del receptor y la hormona, y permite realizar estudios en condiciones de equilibrio (175). La concentración de insulina-¹²⁵I empleada fue de $1-2 \times 10^{-10}$ M y las dosis de insulina no radioactiva para desplazarla variaron entre 10^{-9} M y 10^{-5} M.

Finalizada la incubación se trasvasaron 0,5 ml de muestra sobre 0,9 ml de dibutil-ftalato en tubo cónico Eppendorf y se centrifugaron 5 min en centrífuga "Microfuge". El sobrenadante, conteniendo la hormona radioactiva libre, se descartó y el pellet se lavó con 1,3 ml de sacarosa al 10% en solución fisiológica. La radioactividad asociada al pellet se determinó en un contador de centelleo gamma modelo Beckman 4000 con una eficiencia de 60%.

La unión específica de insulina se obtuvo restando del total de radioactividad incorporada, la cantidad no desplazada por 10^{-5} M de insulina nativa.

III.3. RESULTADOS

III.3.1. Estudio del transporte de AIB en timocitos

Cuando se estudió el transporte de AIB en los timocitos de ratas normales (N), Ax y AxD se encontró (Fig.III.1.) que en los animales Ax, diabéticos o no, se produce un incremento significativo en el transporte de AIB con respecto a los normales.

El efecto de la insulina "in vitro" en el transporte de AIB se puede observar en la tabla III.1. Cuando los timocitos provenientes de ratas de 90 días Ax y AxD se incubaron en presencia de 10^{-8} M no se observó ningún efecto de la hormona en el transporte del aminoácido.

Para realizar "in vivo" el estudio del efecto de la insulina fue necesario establecer previamente el momento óptimo, después de la inyección de la hormona, de sacrificar los animales. Para ello se realizaron curvas de glucemia con ratas Ax y AxD.

Las ratas Ax se inyectaron con 1U de insulina cristalina a las 10 hs del día y se sacaron muestras de sangre a los 10,20,45,60,75,90 y 120 min. Las ratas AxD se inyectaron de la misma manera y las muestras de sangre se realizaron a los 15,30,60,90,120,140 y 180 min. Los resultados se muestran en la Fig. III.2.; de acuerdo a ellos se decidió sacrificar los

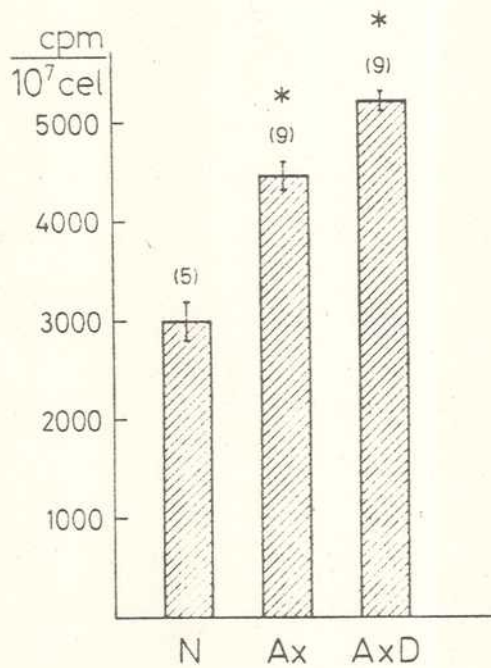


Fig. III.1.: Entrada de AIB en timocitos de ratas de 90 días normales (N), Ax y AxD.

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de (n) determinaciones individuales.

* Diferencia significativa $p < 0,02$ respecto a normales.

Tabla III.1.: Efecto "in vitro" de 10^{-8} M de insulina sobre el transporte de AIB en timocitos de ratas de 90 días Ax y AxD.

Rata	Control cpm/ 10^7 cel	In 10^{-8} M	% Δ
	1410 \pm 28	1359 \pm 63	- 4
Ax	4638 \pm 309	3780 \pm 327	-18
	4622 \pm 243	5004 \pm 330	+ 8
	1522 \pm 89	1333 \pm 58	-12
AxD	5014 \pm 302	4375 \pm 321	-13
	5266 \pm 492	4639 \pm 100	-12

Los resultados corresponden al promedio \pm error standard de experimentos por triplicado.

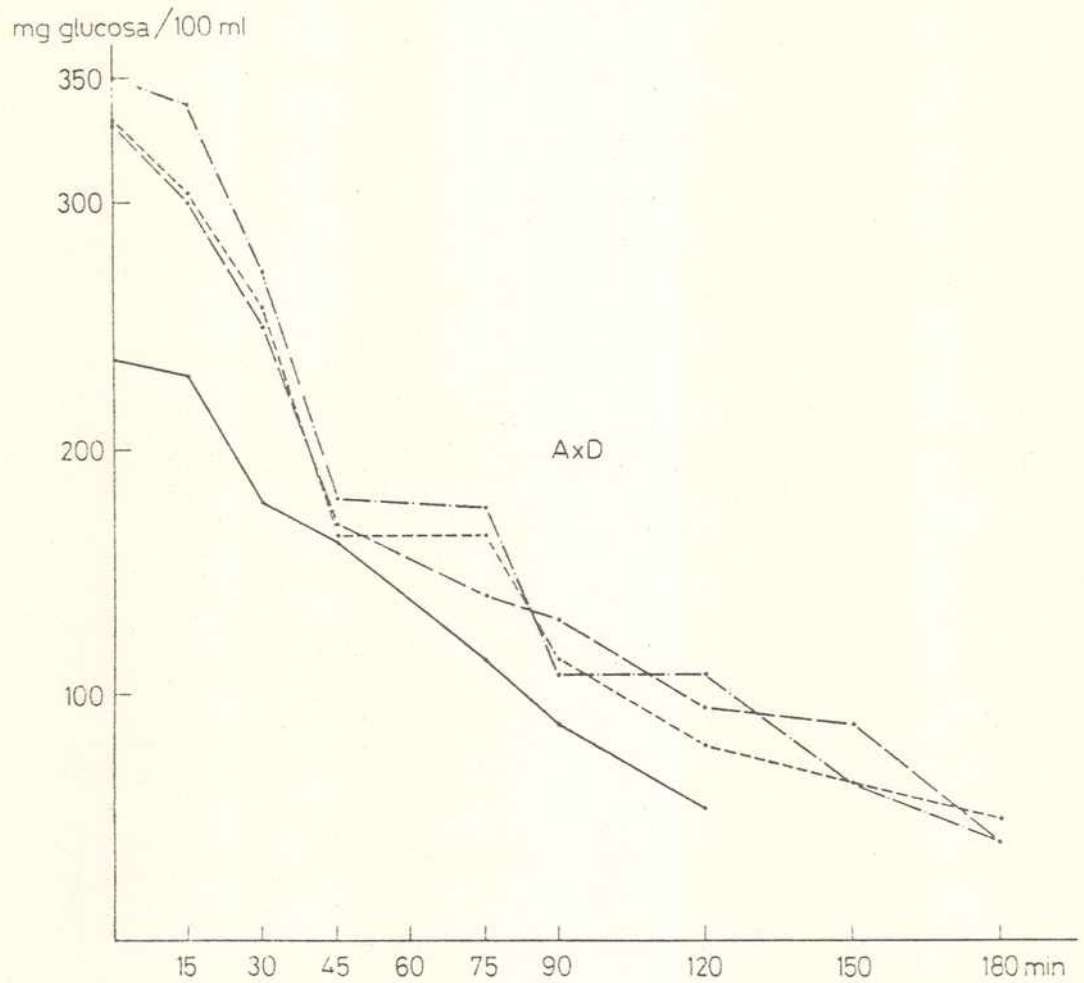
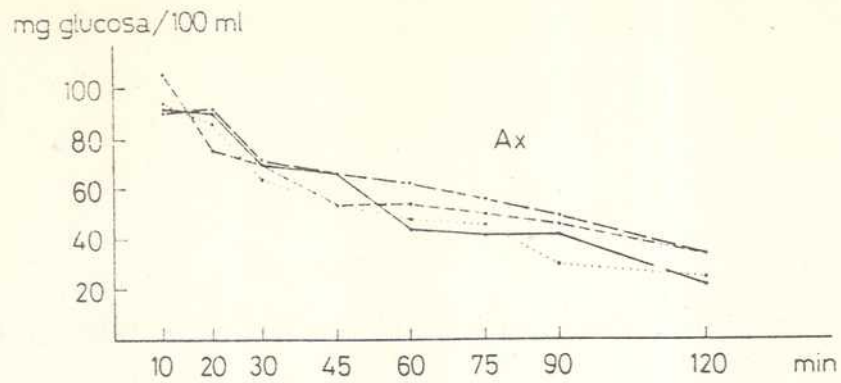


Fig. III.2.: Curva de glucemia en ratas Ax y AxD luego de la inyección de 1 U de insulina, extrayendo las muestras de sangre en los tiempos indicados.

animales cuando los niveles de glucemia oscilaran entre 50 y 70 mg de glucosa por 100 ml de sangre, que corresponde en las Ax a una hora después de la inyección y en las AxD a dos horas. En la tabla III.2. se ve que los timocitos provenientes de estos animales responden a la insulina, dado que la hormona produjo un incremento significativo del transporte de AIB similar en ambos grupos: Ax : $(34 \pm 8)\%$ y AxD ; $(26 \pm 3)\%$.

El hecho de que en nuestras condiciones experimentales la insulina "in vitro" no alterara el transporte de AIB en ratas adultas, contradice lo observado por Goldfine (189,253). Este autor describe una estimulación del transporte de AIB por altas concentraciones de insulina ($10^{-6}M$) en ratas de 20 días, normales; por ello se decidió repetir dicho trabajo con insulina $10^{-6}M$ y $10^{-8}M$ en ratas de la misma edad y de 90 días. Como se ve en la tabla III.3., la mayor concentración de In ($10^{-6}M$) produjo una estimulación significativa de 28% en los animales lactantes pero no en los adultos. La In $10^{-8}M$ no alteró la entrada del aminoácido en ninguno de los dos grupos.

Estos resultados indicarían que la insulina solamente en altas concentraciones estimula el transporte de AIB en timocitos de crías lactantes pero no en ratas adultas normales.

Tabla III.2.: Efecto "in vivo" de insulina (1U) sobre el transporte de AIB en timocitos de ratas de 90 días Ax y AxD.

Rata	Control cpm/ 10 ⁷	In 1 U cel	%Δ	P
	2393 ± 160	3578 ± 70	+ 50	<0,01
Ax	2620 ± 76	3320 ± 160	+ 27	<0,02
	4126 ± 148	5150 ± 183	+ 25	<0,02
	5014 ± 302	6445 ± 169	+ 29	<0,02
AxD	3607 ± 286	4428 ± 285	+ 23	<0,05
	2571 ± 93	3172 ± 37	+ 23	<0,01

Se inyectó 1 U de insulina bovina y se sacrificó a las ratas Ax luego de una hora y a las AxD luego de dos horas.

Tabla III.3. : Efecto "in vitro" de insulina $10^{-8}M$ y $10^{-6}M$ sobre el transporte de AIB en timocitos de ratas normales de 20 y 90 días.

Rata	Insulina	cpm/ 10^7 cel	n	% Δ	P
20 días	--	3115 \pm 106	12	--	--
	$10^{-8}M$	3249 \pm 178	9	+4	N.S.
	$10^{-6}M$	3972 \pm 85	12	+28	<0,001
90 días	--	2934 \pm 198	5	--	--
	$10^{-8}M$	2739 \pm 135	3	-7	N.S.
	$10^{-6}M$	3029 \pm 78	6	+3	N.S.

n = número de determinaciones.

Los resultados corresponden al promedio \pm error standard de las n determinaciones.

III.3.2. Estudio de receptores de insulina en timocitos

Para tratar de explicar la diferencia de comportamiento de los timocitos de ratas de 20 y 90 días frente a la insulina, se estudiaron los receptores para dicha hormona en estas células.

Según puede observarse en la Fig.III.3. la unión de insulina-¹²⁵I a timocitos de ratas lactantes fue directamente proporcional a la concentración de células hasta la mayor densidad celular estudiada en este trabajo. La degradación de la hormona fue igual en todas las concentraciones celulares, oscilando entre un 10 y un 15%.

Los resultados de la unión de insulina-¹²⁵I a timocitos de ratas lactantes se puede observar en la Fig.III.4. Cuando 10^8 células de ratas lactantes se incubaron con 2×10^{-10} M de insulina-¹²⁵I, 0,54% de la radioactividad total se unió a las células. El 36% de la radioactividad unida no fue desplazado por 10^{-5} M de insulina nativa, considerándose esta unión no específica. Esto indicaría la presencia de sitios de unión para la insulina en timocitos de ratas lactantes en concordancia con los trabajos de Goldfine (235). Sin embargo, bajo las mismas condiciones experimentales cuando se trabajó con los timocitos de ratas de 90 días Ax y AxD no se encontró sitios de unión para la insulina-¹²⁵I, pues como se ve en la tabla III.4. la insulina nativa 10^{-5} M no produjo desplazamiento de la insulina radioactiva en ninguno de los dos grupos.

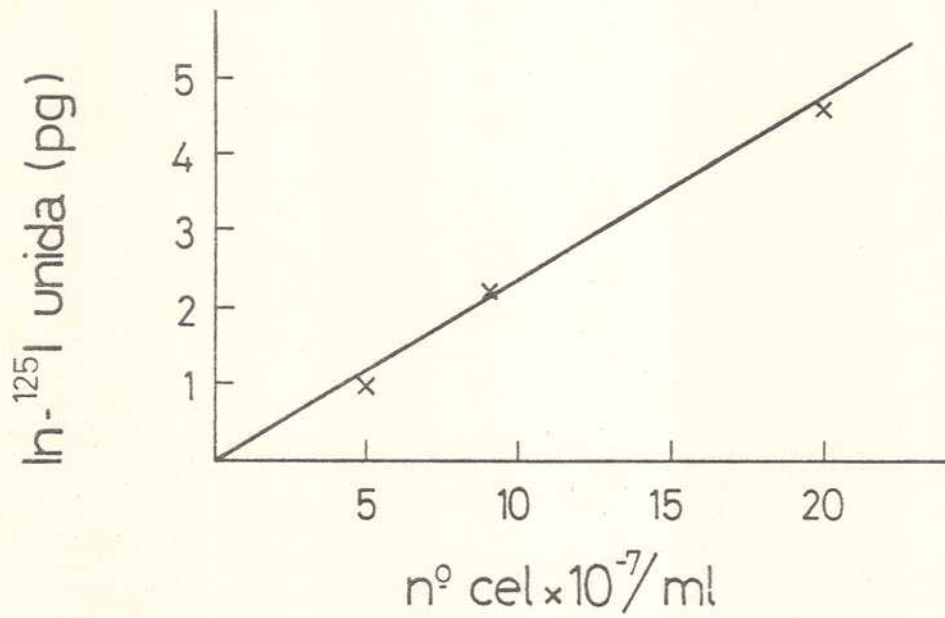


Fig. III.3.: Unión específica de insulina-¹²⁵I a timocitos de ratas de 20 días en función de la concentración celular.

La unión específica se determinó como se detalla en materiales y métodos.

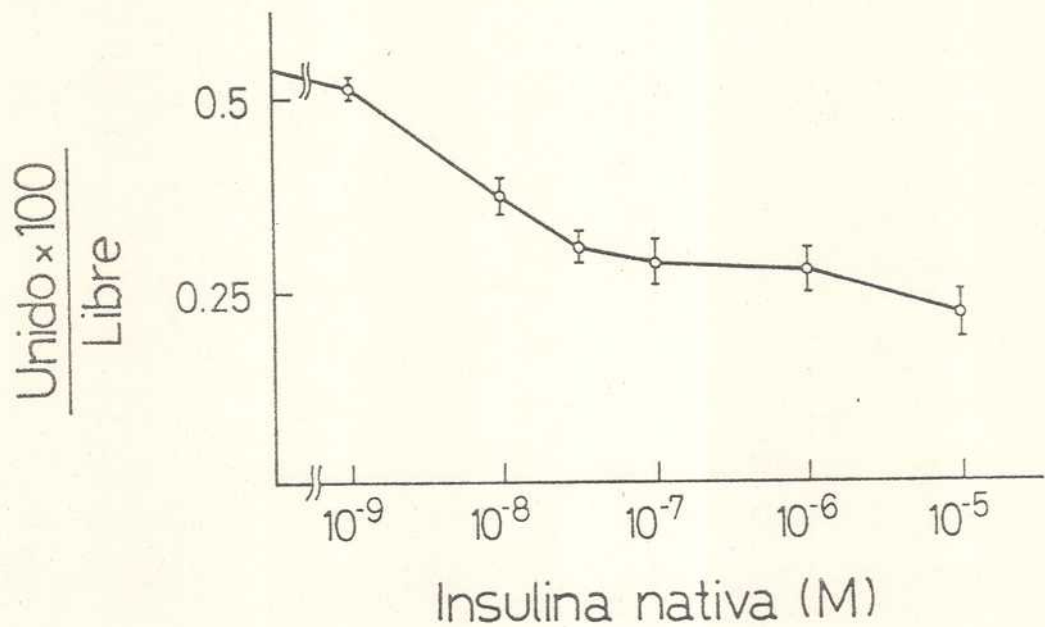


Fig. III.4.: Efecto de distintas concentraciones de insulina no radioactiva sobre la unión de insulina-¹²⁵I en timocitos de ratas de 20 días. Cada punto corresponde al promedio \pm error standard de triplicados.

Tabla III.4.: Unión de insulina- ^{125}I a timocitos de ratas de 90 días Ax y AxD.

Rata	Unión total In- ^{125}I pg/ 10^8 cel	Unión inesp. pg/ 10^8 cel
Ax	40,5 \pm 3,3	45,1 \pm 2,9
AxD	33,1 \pm 2,2	34,5 \pm 0,6

Los resultados corresponden al promedio \pm error standard de un experimento por triplicado.

La unión total se midió en presencia de 10^{-10}M de insulina- ^{125}I y la unión inespecífica en presencia de 10^{-5}M de insulina nativa.

III.4. DISCUSION

El incremento del transporte de AIB observado en timocitos de ratas, tanto Ax como AxD respecto a los N, está en concordancia con el conocido efecto inhibitorio de los GC sobre este mecanismo, descrito tanto en timocitos (56) como en células de hepatoma (255). La diabetes en los animales Ax no produjo alteraciones en dicho transporte lo que indicaría una preponderancia de los GC sobre la insulina en el transporte de aminoácidos en timocitos. Contrariamente a esto, Gelehrter (255) describe en células aisladas de hepatoma, además de la clásica acción inhibitoria de los GC, un efecto potenciador por la insulina, no tan marcado como el de los GC pero que antagoniza al mismo. Considerando que estas células tienen las características de los hepatocitos, esta acción antagónica es explicable ya que los mismos tienen receptores para ambas hormonas.

A pesar de que se han presentado algunas evidencias de la presencia de receptores de insulina en timocitos de rata y de ratón (171,256), los efectos metabólicos de la insulina sobre estas células no han sido suficientemente caracterizados. Hofert (172,177) observó que la insulina incrementa el metabolismo de la glucosa, y Goldfine (235) que estimula la incorporación de aminoácidos a proteínas. Todos estos trabajos se realizaron en ratas lactantes solamente con altas concentra-

ciones de insulina; se podría pensar que tales concentraciones son necesarias dado que no se trata de la insulina propia del animal (se usó insulina bovina).

A pesar de que Goldfine (235) encontró que los timocitos de ratas lactantes y adultas unen la misma cantidad de insulina, Gozes y col (257) no observaron presencia de dichos receptores en timocitos de ratas de tres meses, dato que concuerda con nuestros resultados; siendo ésta una posible causa de la falta de efecto "in vitro" de la insulina sobre el transporte de AIB descrito en este capítulo.

En oposición a esto y en concordancia con Goldfine hemos observado que los timocitos de ratas de veinte días tienen receptores de insulina y el transporte de aminoácidos es sensible a esta hormona.

El hecho de que la insulina en ratas adultas tenga efecto "in vivo" y no "in vitro" sobre el transporte de AIB sugiere que la hormona no tiene una acción directa sobre este mecanismo, resultado que concuerda con la ausencia de receptores para insulina en dichas células.

Estos resultados permiten postular que en los timocitos de ratas adultas la insulina ejerce un efecto indirecto a través de las alteraciones metabólicas producidas por inyección de la misma.

CAPITULO IV

ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES Y LA INSULINA EN

LOS LINFOCITOS HUMANOS ESTIMULADOS

IV.1. INTRODUCCION

En este capítulo se investiga la acción de los glucocorticoides y/o la insulina sobre la respuesta inmune linfocitaria, de acuerdo a las consideraciones realizadas en la discusión del capítulo II. En él se sugiere que la menor sensibilidad a los GC en los timocitos de ratas AxD, podría deberse a un mecanismo de defensa del sistema inmune cuando se elevan los niveles de GC plasmáticos, como sería en el caso de la falta de insulina (diabetes y ayuno) o en tratamientos con GC.

Como ya se trató en la introducción de esta tesis, se sabe que los linfocitos circulantes poseen receptores para GC (105,107), además de que dichas hormonas inhiben la síntesis de ARN y ADN en los linfocitos activados por mitógenos (105). Con respecto a la insulina, si bien los linfocitos carecen de receptores para dicha hormona, estos aparecen en su superficie después de 24 hs de estimulación (154,157), y por otra parte se han descrito una diversidad de efectos de la insulina sobre distintas células del sistema inmune (161).

Es sabido que la insulina antagoniza muchas de las acciones producidas por los GC, tales como hiperglucemia, balance negativo del nitrógeno y pérdida de peso. Por ejemplo, en la células grasa los GC disminuyen la entrada de glucosa y aumentan la lipólisis, y la insulina en contraste aumenta la entrada y oxidación de glucosa y disminuye la lipólisis. En

músculo, las acciones de los GC son también catabólicas, aumentan la velocidad de proteólisis, mientras que la insulina aumenta la entrada de aminoácidos y la síntesis de proteínas; en el hígado, los GC aumentan el balance negativo de nitrógeno aumentando la velocidad de síntesis de urea mientras que la insulina disminuye la ureogénesis, también los GC incrementan la gluconeogénesis aumentando la actividad de las enzimas claves de este paso metabólico, mientras que la insulina disminuye la gluconeogénesis aumentando la glucólisis.

Estudios en el hombre y en animales han mostrado que la sensibilidad de los tejidos a la insulina está regulada por una variedad de factores (258) y hormonas(259). Los tejidos periféricos son resistentes a la acción de la insulina tanto en obesidad como en estados en los que se producen exceso de GC y hormona de crecimiento. Inversamente, en estados relacionados con deficiencias de estas hormonas, los tejidos periféricos son más sensibles a la insulina tanto "in vivo" como "in vitro". Ha sido ampliamente estudiado el mecanismo de interacción de estas dos hormonas. La administración de GC a ratas conduce a la disminución en el número de receptores de insulina en adipocitos y hepatocitos (260). Sin embargo, la incubación de adipocitos con GC "in vitro" no tiene efecto sobre la unión de insulina, a pesar de que disminuye el transporte de glucosa (261). Estos trabajos sugieren que los GC directamente inhiben el transporte de glucosa en adipocitos, y que

la disminución de la unión de insulina observado luego de la administración "in vivo" de GC sería una consecuencia de los altos niveles circulantes de insulina, los cuales a su vez disminuyen los sitios de unión de insulina en los tejidos "target" (259,261), creando de esta manera un estado resistente a la insulina.

Los estudios realizados en el hombre han sido bastante contradictorios. Fantus y col (262) han encontrado que la administración de prednisona no produce alteraciones en la unión de insulina a monocitos a pesar de inducir un estado hiperinsulinémico; sin embargo, Beck-Nielsen y col (263) encontraron lo opuesto, a pesar de que la dexametasona y la cortisona disminuyen los receptores de insulina (264). Estos autores sugieren que la resistencia a la insulina no sería consecuencia directa de un defecto en el receptor de insulina sino probablemente dependería de una alteración post-receptor.

En consideración a todo lo descrito, para llevar adelante el proyecto mencionado al principio se estudió el efecto del cortisol (hormona GC natural del hombre), la dexametasona (GC sintético de acción muy potente) y la insulina sobre la síntesis de ADN en linfocitos humanos provenientes de individuos normales estimulados "in vitro" con PHA, durante 48 hs, y finalmente se decidió investigar la acción conjunta de los GC y la insulina, en base al conocido efecto antagónico entre ellas.

IV.2. MATERIALES Y METODOS

IV.2.1. Drogas y soluciones

Metil-timidina ^3H (AE 6,7 Ci/mmol) fue provista por New England Nuclear (Boston M.A.).

Ficoll (PM = 400.000), dextrans (PM = 465.000), L-glutamina cristalina grado III y Hepes (pka 7,5 a 25°C) fueron marca Sigma (St. Louis Mo.).

La penicilina G-Na (1.000.000 U/ml) fue donada por Squibb, la streptomycin (1g/100 ml) por Lepetit, el Hypaque como sal sódica (solución 75%) por Farmasa Farmacéutica Argentina y la heparina (5.000 U/ml) por Abbott Laboratories Argentina S.R.L.

El medio de cultivo RPMI 1640 y la Phytohemaglutinina M (PHA) (liofilizada) fueron marca GIBCO. El medio RPMI fue esterilizado a través de filtros de 0,45 μm .

El suero fetal bovino (estéril) para suplementar los medios de cultivo fue provisto por Antisueros S.R.L. y fue de-complementado (30 min a 56°C) antes de usar.

La dexametasona y el cortisol fueron gentilmente donadas por el Dr. Alejandro De Nicola.

El resto de las drogas utilizadas fueron descriptas en los capítulos anteriores.

IV.2.2. Extracción y purificación de células mononucleares

Las células mononucleares se obtuvieron de sangre periférica humana según la técnica descrita por Boyum (152).

La sangre venosa humana (40-70 ml) se extrajo en forma estéril con heparina (10U/ ml de sangre), y se diluyó con igual volumen de Dextran 3%, dejándose 30 min a 37°C. El plasma formado se extrajo con pipeta, agregándose en tubos de vidrio 4 ml de dicha dilución sobre 3 ml de Ficoll-Hypaque (densidad = 1,075-1,077) en forma suave por las paredes del tubo, formándose dos fases. Se centrifugó 40 min a 500 g y de esa manera aparece una interfase que es la que contiene las células mononucleares: linfocitos y parte de monocitos y polimorfonucleares; el resto junto con los glóbulos rojos quedaron en el fondo del tubo. La interfase se extrajo con pipeta Pasteur y se trasvasó a tubos cónicos, lavándose tres veces con solución fisiológica más penicilina 1%.

El pellet final se resuspendió en medio de cultivo y las células se contaron en un hemocitómetro Neubauer en ácido acético 3%; la viabilidad se determinó por la exclusión de azul trypan (196) y fue mayor del 95%.

Las células mononucleares se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10 mM de HEPES (pH 7,4-7,5) , 2 mM de L-glutamina, penicilina (100U/ ml), streptomycina (100ug/ ml) y 10% de suero fetal bovino.

IV.2.3. Activación de las células con mitógenos

Los cultivos se realizaron por triplicado o cuadruplicado en tubos de vidrio estériles de 10 x 75 mm, cerrados con tapones de goma, conteniendo cada uno 10^6 cel/ml. El mitógeno utilizado fue Phitoheماغlutinina-M. El mismo se resuspendió en 5 ml de agua bidestilada estéril; 0,2 ml de esta solución madre se diluyeron a 2 ml con medio de cultivo y alícuotas de esta dilución se agregaron a cada tubo para obtener los cultivos estimulados.

La suspensión de células se cultivó en estufa a 37°C durante 48 hs.

IV.2.4. Determinación de la síntesis de ADN.

La síntesis de ADN se midió en las células cultivadas por agregado de 0,5 uCi de metil-timidina ^3H / ml en las últimas 5 hs.

A las 48 hs, los cultivos se centrifugaron a 1.500 g. El pellet final se resuspendió en 1 ml de agua destilada para romper las células y se precipitó con 0,4 ml de TCA 25% (concentración final 7%). El ADN se recibió sobre filtros de fibra de vidrio (Whatman, Clifton N.Y.), y se lavó sucesivamente con ClH 0,2 N, ClH 0,05 N y etanol. Los filtros se secaron y se transfirieron a un vial de plástico con 3 ml de tolueno cen-

tellante y se contaron en un contador de centelleo líquido modelo Beckman LS 100C , con una eficiencia para tritio de 65%.

IV.2.5. Hormonas

La insulina se disolvió en 6,6 mM de ClH para dar una concentración de 10^{-5} M y se pasó a través de un filtro Millipore tipo SLGS 0,25 OS y la solución estéril se mantuvo a 4°C.

Los glucocorticoides (dexametasona y cortisol) se disolvieron en etanol absoluto para dar una concentración de 10^{-4} M y 10^{-3} M respectivamente, y se pasaron a través de filtro como la insulina, manteniéndose las soluciones estériles a 4°C.

Las diferentes diluciones se hicieron en medio de cultivo y se agregaron las alícuotas al cultivo de células en los tiempos indicados (tiempo cero: junto con el mitógeno al comienzo del cultivo y tiempo 24: luego de 24 hs de estimulación).

El suero fetal bovino contenía insulina 8 uU/ ml y cortisol 0,4 ug/ 100 ml de plasma, determinados por radioinmunoensayo en el laboratorio del Dr. Juan Carlos Cresto del Hospital Pedro Elizalde.

Todas las operaciones descritas como estériles, fueron realizadas con material y bajo atmósfera estéril (flujo laminar Edgegard, BAKER, Co, Inc. Sanford, Maine USA).

IV.2.6. Ayuno de los linfocitos

Una vez extraídos los linfocitos se incubaron durante 16 hs en RPMI 1640 con 10% de FCS a 37°C. Luego de este tiempo se centrifugó y se aspiró todo el medio de cultivo, resuspendiéndose las células en buffer Hanks sin glucosa ni suero durante cuatro horas (período de ayuno). Posteriormente las células se centrifugaron, se resuspendieron en medio completo y se cultivaron en presencia de 20 ul de PHA durante 48 hs en presencia o ausencia de insulina 10^{-9} M; 5 hs antes de sacrificar el cultivo se dio un pulso de 0,5 uCi de timidina- 3 H. Los respectivos controles se trataron como las células ayunadas nada más que durante las 4 hs de ayuno se mantuvieron en medio completo con 10% de suero fetal bovino.

IV.2.7. Degradación de la insulina- 125 I

La determinación de la integridad de la molécula de insulina en el medio de cultivo de células mononucleares estimuladas con PHA durante 48 hs se realizó de la siguiente manera: insulina- 125 I 6×10^{-10} M se agregó a las cero y 24 hs de iniciado el cultivo. Una vez sacrificado el mismo, 0,1 ml del medio de cultivo se precipitó con 0,9 ml de TCA 5%, se centrifugó 15 min a 1.000 g, se separó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 ml de TCA 5%; después de centrifugado, el segundo

sobrenadante se unió al primero. La radioactividad asociada al sobrenadante (insulina degradada) y la del pellet (insulina no degradada) se midió en un contador gamma modelo Packard 4.000.

IV.3. RESULTADOS

IV.3.1. Efecto de los glucocorticoides sobre los linfocitos estimulados

Para estudiar el efecto de los GC, el cortisol (F) y la dexametasona (Dex), sobre la síntesis de ADN se hizo una curva dosis respuesta agregando la hormona al comienzo del cultivo, junto con 20 ul del mitógeno. Como se puede ver en la Fig. IV.1., en presencia de cortisol 10^{-9} M, la menor concentración empleada, el efecto inhibitorio sobre la incorporación de timidina- 3 H fue de 10%, aumentando la inhibición al incrementar la concentración de la hormona llegando a 60% de inhibición con cortisol 10^{-6} M. Con Dex también se obtuvo una respuesta dosis dependiente, pero como es un glucocorticoide de acción más potente, su efecto se desplazó a menores concentraciones: con Dex 10^{-11} M se tuvo un efecto inhibitorio sobre la síntesis de ADN de 21%, alcanzándose el efecto máximo de 82% con 10^{-8} M. Las dosis que produjeron el 50% de inhibición (DE_{50}) fueron para el cortisol entre 10^{-7} M y 10^{-8} M y para la Dex entre 10^{-10} M y 10^{-9} M.

Como el efecto inhibitorio podría deberse a un efecto citolítico de las hormonas, y no a la inhibición de la síntesis de ADN, se determinó la viabilidad celular en los cultivos de 48 hs en presencia de dos concentraciones de GC y en ausen-

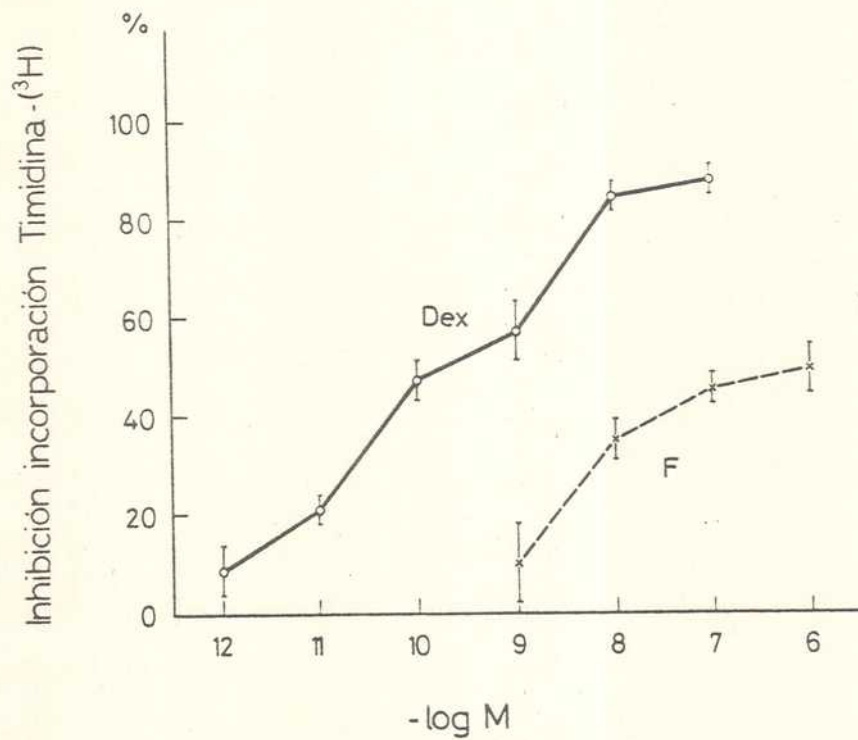


Fig. IV.1.: Efecto inhibitorio de la dexametasona (Dex) y el cortisol (F) sobre la incorporación de timidina-³H en linfocitos humanos estimulados con 20 ul de PHA durante 48 hs. Cada valor es el promedio \pm error standard de por lo menos cuatro determinaciones.

cia del mitógeno. La PHA produce aglutinación de las células impidiendo hacer un buen conteo de las mismas.

La viabilidad con cortisol 10^{-8} M o 10^{-6} M osciló entre 85% y 90% y con Dex 10^{-11} M o 10^{-9} M entre 80% y 93%. Estos resultados indican que los GC no tienen efecto citolítico sobre las células mononucleares humanas aún después de 48 hs de estar en contacto con las mismas.

Dado que los linfocitos humanos en reposo tienen receptores para GC (106), se estudió el efecto de estas hormonas sobre las células no estimuladas. La tabla IV.1. muestra que el efecto inhibitorio de la Dex sobre la síntesis de ADN en estas células, sigue también una respuesta dosis dependiente. Con Dex 10^{-11} M no hay efecto, con Dex 10^{-9} M la inhibición es de 20%, alcanzándose un 47% con Dex 10^{-7} M. Cuando se ensayó la acción del F sobre los linfocitos sin estimular, 10^{-9} M no tuvo efecto y la inhibición de 37% con F 10^{-8} M aumentó a 60% con 10^{-6} M.

Por último, considerándose que los linfocitos después de 24 hs de estimulación aumentan el número de receptores de GC (105,107), se estudió el efecto de la Dex y el F en linfocitos estimulados poniendo la hormona luego de 24 hs de agregado el mitógeno.

Como se puede ver en la Fig. IV.2., cuando estas hormonas fueron agregadas a las 24 hs de iniciado el cultivo el efecto inhibitorio fue significativamente menor que cuando la hormona estuvo presente durante las 48 hs, dentro de todos los

Tabla IV.1 : Efecto inhibitorio del cortisol(F) y la dexametasona (Dex) sobre la síntesis de ADN en linfocitos sin estimular durante 48 hs.

Hormona	cpm/ 10^6 cel	% inhib.	P
--	2119 \pm 221	--	
F 10^{-9} M	2283 \pm 237	+ 7	N.S.
" 10^{-8} M	1330 \pm 106	-37	<0,05
" 10^{-7} M	1172 \pm 60	-45	<0,01
" 10^{-6} M	846 \pm 38	-60	<0,01
--	218 \pm 21	--	
Dex 10^{-11} M	222 \pm 7	0	N.S.
" 10^{-9} M	175 \pm 15	-20	N.S.
" 10^{-7} M	116 \pm 10	-47	<0,01

Cada valor corresponde al promedio \pm error standard de un experimento por triplicado para cada hormona.

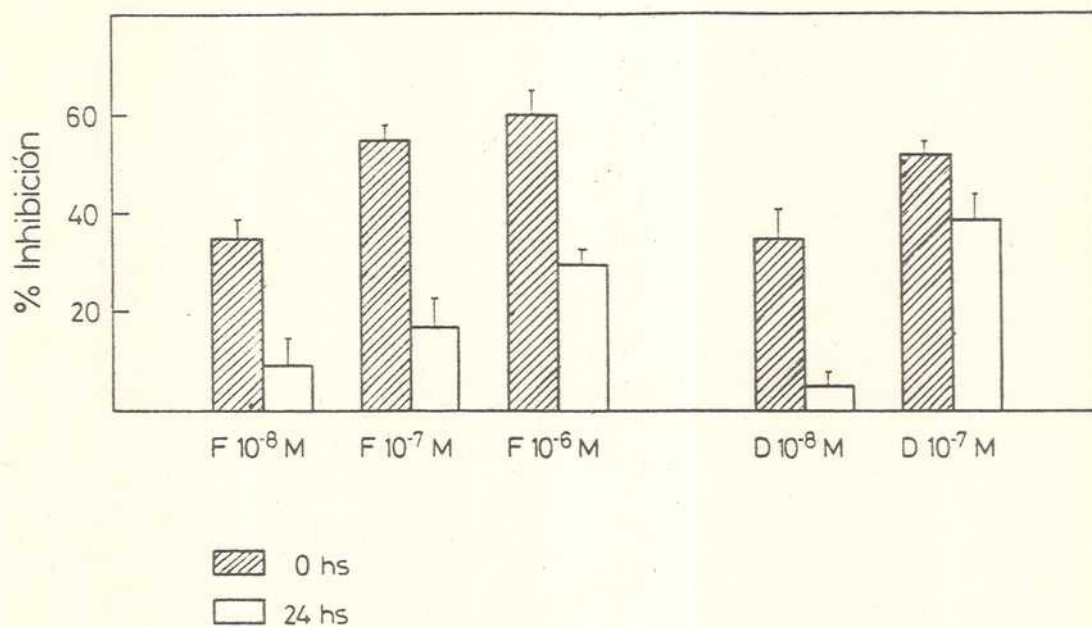


Fig. IV. 2.: Efecto inhibitorio de la dexametasona (Dex) y el cortisol (F) agregados a las cero hora (▨) y a las 24 hs (□) del cultivo, sobre la incorporación de timidina- ^3H en linfocitos humanos estimulados con 20 ul de PHA durante 48 hs. Los resultados corresponden al promedio \pm error standard de dos experimentos.

rangos de concentraciones ($10^{-8}M$ y $10^{-6}M$).

Estos resultados indicarían que para un mismo tiempo de cultivo la inhibición de la síntesis de ADN es mayor cuando la hormona está presente desde el comienzo del cultivo, como ha sido demostrado por otros autores (96-98).

IV.3.2. Efecto de la insulina sobre los linfocitos estimulados

Se estudió el efecto de la insulina entre $10^{-10}M$ y $10^{-6}M$ sobre la síntesis de ADN en linfocitos humanos estimulados con 20 ul de PHA durante 48 hs.

Según puede observarse en la Fig.IV.3. existió una gran dispersión en la respuesta. En cuatro de seis experimentos hubo una estimulación dosis dependiente; en uno, estimulación de aproximadamente 20% a todas las concentraciones, y finalmente uno con efecto inhibitorio de también 20% en todo el rango de concentraciones, que se encontró también en otros experimentos individuales con insulina $10^{-8}M$ y $10^{-9}M$. A la máxima concentración, $10^{-6}M$, hubo un marcado efecto inhibitorio que se podría explicar como un fenómeno de "down regulation", de acuerdo a lo observado por otros autores (265,267). En tres de los experimentos, la máxima estimulación se alcanzó con una dosis de insulina de $10^{-8}M$.

En vista de la gran dispersión observada en la respuesta a la insulina y teniendo en cuenta que los receptores

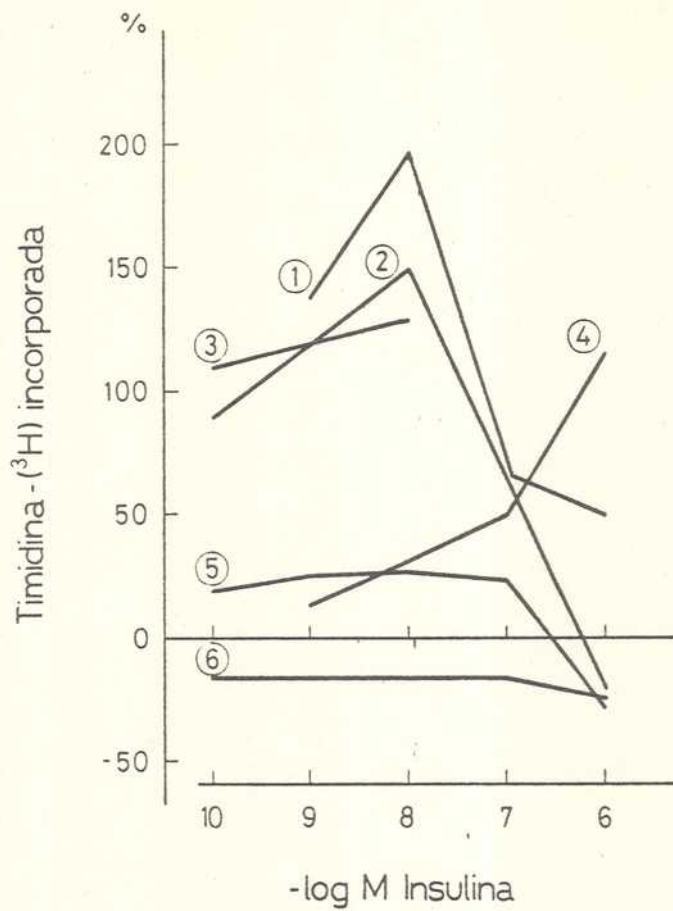


Fig. IV.3.: Acción de insulina (10^{-10} M a 10^{-6} M) sobre la incorporación de timidina- 3 H en linfocitos humanos estimulados con 20 μ l de PHA durante 48 hs. Cada curva corresponde a un experimento individual. Cero: corresponde a la timidina- 3 H incorporada en los linfocitos estimulados con PHA en ausencia de insulina.

de insulina aparecen en el linfocito luego de 24 hs de activación, se pensó que el efecto de la hormona podría ser directamente sobre el linfocito activado. De acuerdo a ello y para tratar de que el comportamiento de la insulina fuera más uniforme se decidió agregarla 24 hs después del mitógeno. Como puede observarse en la Fig. IV.4. existió también en este caso una gran disparidad en la respuesta: en un experimento se observó una marcada estimulación, especialmente con dosis bajas y en los otros dos, en uno la insulina no tuvo efecto y en el otro hubo inhibición.

Con los resultados obtenidos hasta el momento no se podía sacar ninguna conclusión del efecto de la insulina sobre la activación linfocitaria. Recapitulando sobre los experimentos realizados se descubrió un punto no considerado, que era el origen de las células utilizadas. Estas provenían de distintos individuos que aunque normales podían encontrarse en distintas condiciones metabólicas. Para tratar de normalizar estas condiciones se resolvió ayunar las células durante 4 hs previamente al agregado del mitógeno y la insulina.

En la tabla IV.2. se presentan los resultados de dichos experimentos, en los cuales se puede observar que el ayuno de las células, no mejoró las condiciones experimentales de manera de unificar el efecto de la insulina sobre la incorporación de timidina-³H. En dos de cuatro experimentos la insulina no alteró la incorporación de timidina-³H respecto a

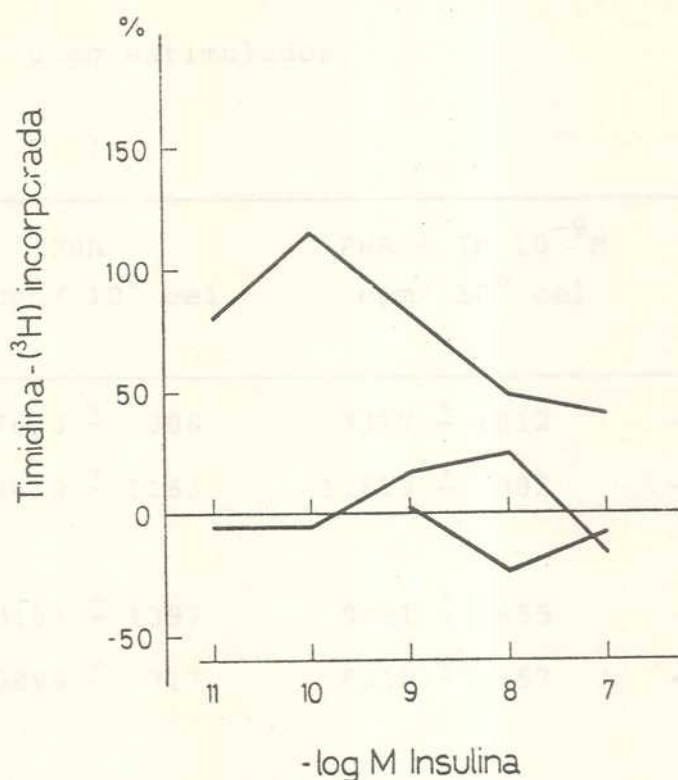


Fig. IV.4.: Efecto del agregado de la insulina ($10^{-11}M$ a $10^{-7}M$) a las 24 hs del cultivo sobre la incorporación de timidina- 3H en linfocitos humanos estimulados con 20 ul de PHA durante 48 hs.

Cada curva corresponde a un experimento individual.

Tabla IV.2.: Efecto de insulina 10^{-9} M sobre la incorporación de timidina- 3 H en linfocitos humanos ayunados y luego estimulados.

Exp.	PHA cpm/ 10^6 cel	PHA + In 10^{-9} M cpm/ 10^6 cel	% Δ	P
1 Ay	7670 \pm 906	7317 \pm 1812	--	N.S.
C	17410 \pm 1163	11673 \pm 982	-33	<0,01
2 Ay	9199 \pm 1397	9451 \pm 855	--	N.S.
C	5895 \pm 717	6315 \pm 557	--	N.S.
3 Ay	14807 \pm 1097	8394 \pm 656	-43	<0,01
C	11458 \pm 723	13561 \pm 330	+18	<0,05
4 Ay	6194 \pm 940	5221 \pm 399	--	N.S.
C	7223 \pm 130	6815 \pm 70	--	N.S.

Ay: ayunados durante 4 hs en Hanks sin suero ni glucosa y posteriormente estimulados con 20 ul de PHA durante 48 hs en RPMI con 10% de FCS en presencia o ausencia de In 10^{-9} M.

C : controles , igual que los ayunados pero durante las 4 hs permanecen en medio completo.

la PHA y en los otros dos la respuesta fue dispersa.

Se pensó entonces que otra posible causa del efecto inhibitorio o no efecto observado en algunos experimentos se podría deber a la degradación y por consiguiente disminución de la concentración de la hormona; esto se podía deber por la presencia en el cultivo de monocitos (268) y enzimas proteolíticas provenientes de células rotas entre ellas glóbulos rojos hemolizados, lo que varía en cada preparación celular (269, 270).

Con la idea de comprobar el grado de degradación de la insulina durante el cultivo se determinó la integridad de la molécula por la precipitación de insulina-¹²⁵I con TCA 5%. Como se puede ver en la tabla IV.3., cuando la insulina-¹²⁵I estuvo presente desde el comienzo del cultivo, la degradación fue de $(50 \pm 3)\%$ y cuando se la agregó a las 24 hs fue de $(31 \pm 1)\%$. La mayor degradación encontrada cuando estuvo presente las 48 hs no justifica la falta de efecto por falta de hormona pues quedaría todavía en el medio de cultivo. una concentración de insulina de $3 \times 10^{-10}M$, que según lo demostrado en la Fig.IV.3. sería suficiente para actuar sobre las células.

Resumiendo, hasta este momento no se pudo explicar la causa de la gran dispersión observada entre experimentos, pues ni el ayuno de las células, ni el agregado de la hormona cuando aparecen sus receptores en los linfocitos estimulados ni la degradación de la misma unificaron los resultados.

Tabla IV.3.: Degradación de la insulina-¹²⁵I en células mononucleares estimuladas con 20 ul de PHA.

Exp.	In- ¹²⁵ I 6 x 10 ⁻¹⁰ M		% insulina degradada
	0 hs	24 hs	
1	+	-	47 ± 2
	-	+	30 ± 1
2	+	-	54 ± 2
	-	+	31 ± 1

Linfocitos humanos cultivados durante 48 hs en RPMI 1640 con 10% de FCS estimulados con 20 ul de PHA en presencia de insulina-¹²⁵I agregada al iniciarse el cultivo (0hs) o después de 24 hs (24 hs). Los resultados corresponden al promedio ± error standard de dos experimentos por duplicado.

En todos los experimentos realizados hasta ese momento se había determinado el índice de estimulación linfocitaria, que se calcula como el cociente entre la timidina-³H incorporada en las células estimuladas respecto a la incorporada por las células sin estimular. Volviendo a la Fig. IV.3. se observó que los experimentos en los cuales la insulina tenía un efecto estimulatorio coincidían con un índice de estimulación menor de 20 y cuando el efecto de la hormona era inhibitorio o no había efecto el índice era mayor de 20 (tabla IV.4.).

Es sabido que la estimulación mitogénica depende de varios factores, entre otros: sensibilidad del individuo donante, población celular y dosis del mitógeno. Con respecto a este último, se ha demostrado que la PHA como la Con A son mitógenos que a altas concentraciones, por encima de la dosis mitogénica óptima, produce inhibición de su propio efecto mitogénico (271-273). De acuerdo a ello se pensó que los 20 ul de PHA agregados a los cultivos podrían ser, en algunos casos, una dosis supraóptima que ejerciera un efecto autoinhibitorio enmascarando la verdadera acción de la insulina.

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente se realizó en ese momento lo que tendría que haberse hecho en un principio: determinar la concentración óptima del mitógeno en nuestras condiciones de trabajo. Para ello se realizaron varios cultivos en presencia de distintas dosis de PHA.

Tabla IV.4.: Índice de estimulación de los experimentos del gráfico IV.3. en relación al efecto de la insulina sobre la síntesis de ADN en linfocitos estimulados con PHA.

Exp.	Efecto de In.	I.E.
1	estimulación	12
2	estimulación	15
3	estimulación	9
4	estimulación	20
5	no efecto	32
6	inhibición	40

I.E.: Cociente entre la timidina-³H incorporada en células estimuladas respecto a las células sin estimular.

En la tabla IV.5. se muestran los resultados de cuatro experimentos. Como puede observarse existe una gran variación en la cantidad de timidina-³H incorporada por las células para la misma dosis del mitógeno , fenómeno que ha sido descrito por otros autores (274). Sin embargo, entre 0,5 y 5 ul de PHA (dosis subóptima) existe una respuesta dosis dependiente entre cantidad de mitógeno agregada y timidina-³H incorporada y a valores supraóptimos (50 ul) se observa el mencionado efecto autoinhibitorio,

En vista de estos resultados las células se incubaron con distintas concentraciones de PHA, en presencia o ausencia de insulina 10^{-9} M. En la tabla IV.6. puede observarse que la insulina produce una potenciación de la acción de la PHA, encontrándose el efecto máximo a las menores concentraciones del mitógeno. Por encima de la dosis mitogénica óptima, la insulina potencia el efecto autoinhibitorio del mitógeno, explicándose de esta manera lo que podría llamarse "efecto inhibitorio de la insulina"

IV.3.3. Acción conjunta de los glucocorticoides y la insulina sobre los linfocitos estimulados

Debido a que el efecto potenciador mitogénico por parte de la insulina depende de la dosis de PHA utilizada , antes de realizar los experimentos con insulina y glucocorticoides

Tabla IV.5.: Efecto de distintas concentraciones de PHA sobre la incorporación de timidina-³H en linfocitos humanos.

PHA	cpm / 10 ⁶ cel							
	1		2		3		4	
0,0	965 ± 30	590 ± 170	1391 ± 162	774 ± 95				
0,5	---	---	---	1697 ± 507				
1,0	---	---	---	8260 ± 1410				
2,0	---	---	34299 ± 590	33786 ± 2570				
5,0	23537 ± 1678	12462 ± 505	50636 ± 2842	---				
10,0	36868 ± 5282	13237 ± 1042	23440 ± 1428	---				
20,0	38561 ± 3022	17792 ± 894	---	---				
50,0	24271 ± 3034	15466 ± 2119	13740 ± 224	---				

Los resultados corresponden al promedio ± error standard de experimentos por triplicado.

Tabla IV.6.: Efecto de insulina 10^{-9} M sobre la incorporación de timidina- 3 H en linfocitos humanos estimulados con distintas concentraciones de PHA.

PHA ul	Control cpm/ 10^6 cel.	In. 10^{-9} M cpm/ 10^6 cel.	% Δ	P
0,0	854 \pm 121	909 \pm 102	6	N.S.
0,5	2350 \pm 634	4582 \pm 178	95	<0,02
2,0	22172 \pm 2254	31590 \pm 1400	42	<0,02
5,0	37896 \pm 3656	40223 \pm 7878	6	N.S.
20,0	21417 \pm 1450	16931 \pm 602	-21	<0,05

Los resultados corresponden al promedio \pm error standard de un experimento por triplicado.

agregados juntos a la cero hora del cultivo, se estudió el efecto del cortisol en concentración baja ($10^{-8}M$) y alta ($10^{-6}M$) sobre la estimulación producida por distintas dosis de PHA. En la tabla IV.7. puede observarse que las células estimuladas con dosis bajas del mitógeno son más sensibles a la inhibición que las que fueron estimuladas con dosis altas.

Considerando que el efecto de la insulina y el cortisol sobre la activación linfocitaria, depende no solamente de la concentración de hormona utilizada sino también de la del mitógeno, se decidió llevar a cabo los experimentos que se describen a continuación en los que se muestra el efecto conjunto de estas hormonas sobre células estimuladas con distintas dosis de PHA. Ambas hormonas se utilizaron en un rango de concentraciones fisiológicas, cortisol entre $10^{-8}M$ y $10^{-6}M$ e insulina entre $10^{-10}M$ y $10^{-8}M$.

En la tabla IV.8. se presentan dos experimentos realizados con 1 ul de PHA. En el primero de ellos, donde la estimulación mitogénica fue baja, la insulina $10^{-8}M$ produjo una estimulación significativa de 91% sobre la PHA, pero con $10^{-10}M$ no llegó a ser significativa. En el segundo experimento, en donde el efecto de esta dosis de PHA fue mayor, se muestra la acción de cortisol e insulina. Cortisol $10^{-6}M$ produjo una incorporación de timidina- 3H de solamente 15%, efecto que no pudo ser revertido por insulina $10^{-8}M$ ni $10^{-10}M$, que sí antagonizaron la acción inhibitoria de cortisol $10^{-8}M$.

Tabla IV.7 : Efecto inhibitorio de cortisol (F) $10^{-8}M$ y $10^{-6}M$ sobre la incorporación de timidina- 3H en linfocitos humanos estimulados con diferentes concentraciones de PHA durante 48 hs.

PHA	Control	F $10^{-8}M$	%	F $10^{-6}M$	%
ul	cpm/ 10^6 cel.	cpm/ 10^6 cel.	Inh.	cpm/ 10^6 cel.	Inh.
1,0	28162 \pm 2585	14969 \pm 2065	-47	4383 \pm 644	-84
2,0	36481 \pm 2174	27619 \pm 1137	-24	22925 \pm 1010	-37
20,0	8805 \pm 322	---	--	6248 \pm 565	-29

Los resultados corresponden al promedio \pm error standard de triplicados.

Tabla IV.8.: Efecto de insulina (In) $10^{-8}M$ y $10^{-10}M$ sobre la incorporación de timidina- 3H en linfocitos humanos estimulados por 1 ul de PHA.

Efecto inhibitorio del cortisol (F) en presencia o ausencia de In.

Agregados	cpm/ 10^6 cel.	% Timid. incorpor.
PHA 1 ul	11108 \pm 1244	100
" " + In $10^{-8}M$	21234 \pm 2262*	191
" " + In $10^{-10}M$	13663 \pm 1452	120
PHA 1 ul	28162 \pm 2585	100
" " + F $10^{-6}M$	4383 \pm 644*	15
" " + " + In $10^{-8}M$	4903 \pm 1583*	17
" " + " + In $10^{-10}M$	3798 \pm 247*	13
" " + F $10^{-8}M$	14969 \pm 2065*	53
" " + " + In $10^{-8}M$	23143	82
" " + " + In $10^{-10}M$	23567 \pm 2135+	84

Los resultados corresponden al promedio \pm error standard de triplicados. Diferencias estadísticamente significativas:

* contra PHA, + contra F.

La tabla IV.9. muestra dos experimentos realizados con 5 ul de PHA. En el primero, en el cual la acción mitogénica fue baja, la incorporación de timidina-³H en presencia de cortisol 10^{-6} M fue de 67%, que pudo ser revertida por insulina 10^{-8} M y 10^{-9} M, pero no por 10^{-10} M. En el segundo experimento, en el que la acción mitogénica fue más potente, el efecto inhibitorio de la misma concentración de cortisol fue mayor, no siendo antagonizado por ninguna concentración de insulina. El efecto de cortisol 10^{-7} M sobre la incorporación de timidina-³H fue antagonizado por insulina 10^{-8} M y no por 10^{-10} M; sin embargo el cortisol 5×10^{-8} M fue antagonizado por las dos concentraciones de insulina.

Dado que la dexametasona es una droga sintética de potente acción farmacológica, no se estudió el efecto antagónico entre ella y la insulina, pues como se estableció en los objetivos de esta tesis el enfoque de este trabajo es fisiológico. A pesar de ello, en dos experimentos realizados con 5 ul de PHA, se observó en uno que la insulina en una concentración de 10^{-9} M disminuyó la inhibición de 58% producida por Dex 10^{-9} M a 29%. En el otro experimento, la misma concentración de insulina no alteró la inhibición de 66% producida por Dex 10^{-9} M, pero antagonizó la de Dex 10^{-10} M. (Fig.IV.5.)

Tabla IV.9.: Efecto inhibitorio del cortisol (F) en presencia o ausencia de insulina (In) sobre la incorporación de timidina-³H en linfocitos humanos estimulados con 5 ul de PHA.

Agregados	cpm/10 ⁶ cel.	% Timid- incorpor.
PHA 5 ul	9389 ± 624	100
" " + F 10 ⁻⁶ M	6248 ± 565*	67
" " " + In 10 ⁻⁸ M	9096 ± 188 ⁺	97
" " " + In 10 ⁻⁹ M	8406 ± 533 ⁺	90
" " " + In 10 ⁻¹⁰ M	6763 ± 413*	72
PHA 5 ul	24127 ± 808	100
" " + F 10 ⁻⁶ M	8607 ± 707*	36
" " + " + In 10 ⁻⁸ M	7359 ± 64*	31
" " + " + In 10 ⁻¹⁰ M	7735 ± 359*	32
" " + F 10 ⁻⁷ M	16393 ± 919*	68
" " + " + In 10 ⁻⁸ M	19854 ± 130*+	76
" " + " + In 10 ⁻¹⁰ M	20125 ± 2210	83
" " + F 5 x 10 ⁻⁸ M	15375 ± 916*	67
" " + " + In 10 ⁻⁸ M	20149 ± 275*+	83
" " + " + In 10 ⁻¹⁰ M	21110 ± 503*+	87

Diferencias estadísticamente significativas: * contra PHA + contra F.

Los resultados corresponden al promedio ± error stanadrd de triplicados.

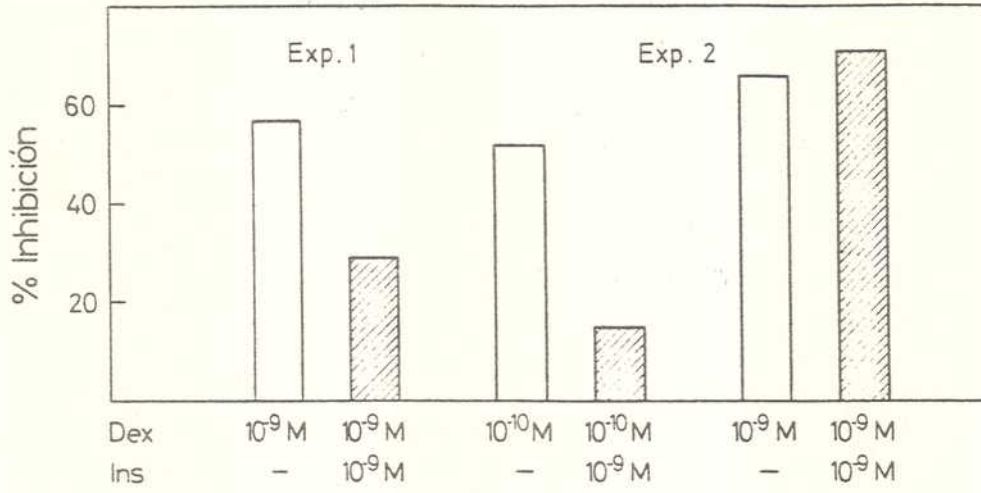


Fig. IV.5.: Efecto inhibitorio de la dexametasona (Dex) en presencia o ausencia de insulina (In) sobre la incorporación de timidina-³H en linfocitos humanos estimulados con 5 ul de PHA.

□ Dex ▨ Dex + In

IV.4. DISCUSION

En concordancia con los resultados de otros investigadores (105,221), en el presente trabajo se observó que el cortisol y la dexametasona inhibieron la acción mitogénica de la PHA en linfocitos humanos. La Dex por ser un glucocorticoide sintético de acción muy potente, utilizado en concentraciones farmacológicas, produjo mayor inhibición que el F, hormona natural del hombre; la mayor concentración de ésta (10^{-6} M) corresponde aproximadamente a concentraciones suprafisiológicas de la hormona, posibles de encontrar en el plasma en situaciones de stress.

El efecto inhibitorio del cortisol dependió no solamente de la concentración presente sino también de la dosis de PHA utilizada, encontrándose la mayor sensibilidad a la acción supresora del GC con concentraciones subóptimas del mitógeno, como ya ha sido demostrado (275-277).

Por otra parte, la inhibición de la incorporación de timidina-³H por los GC en los linfocitos estimulados, se realizó sobre la síntesis de ADN y no fue consecuencia de un efecto citolítico aún en sus más altas concentraciones. Dichos resultados concuerdan con lo descrito por Lippman (105), y se halla en oposición al conocido efecto lítico de estas hormonas sobre los timocitos (45,225), y en correspondencia al efecto inhibitorio sobre la síntesis de ARN sobre las mismas células.

Muestra de ello es lo observado en nuestro laboratorio, en que cortisol 10^{-7} M y corticosterona 10^{-5} M producen un 65% de lisis en las células del timo de la rata luego de 16 hs de incubación, llegando a 70% con 10^{-4} M (278).

Ha sido bastante discutida la acción de los GC en los linfocitos estimulados, cuando son agregados después de la activación. Estudios "in vitro" han sugerido que la sensibilidad a los GC varía con el estado de activación mitogénica. Nowell (96) observó que prednisolona-21-fosfato reduce el número de mitosis inducidas por PHA en linfocitos humanos circulantes; siempre y cuando esté presente las primeras 24 hs de la estimulación. Tormey y col (97) demostraron que esta hormona inhibe la incorporación de timidina y citidina en linfocitos estimulados con PHA y que un retraso en el agregado del GC produce una menor inhibición; Ono y col (99) observaron lo mismo con hidrocortisona en la incorporación de uridina a ARN.

Estas observaciones llevaron a considerar que en los linfocitos circulantes activados había una fase temprana de mayor sensibilidad a los GC, para luego hacerse menos sensible; por ello se pensó que la sensibilidad a los GC varía con el estado de activación inmunológica de la célula.

En nuestro caso, el menor efecto inhibitorio hallado al agregar el cortisol o la dexametasona 24 hs después de la activación mitogénica, en relación al agregado a la cero hs y durante un tiempo fijo de activación (48 hs), se debería a

que a la cero hora se estaría bloqueando el proceso de activación blastogénica, mientras que a las 24 hs solamente se estaría atenuando una respuesta que ya está en desarrollo. Sin embargo, Smith y col (106), trabajando con distintos tiempos de estimulación pero iguales períodos en presencia de GC, encontraron que los linfocitos activados permanecen igualmente sensibles a dichas hormonas a lo largo del período de activación. Por ello sugieren que el efecto inmunosupresor de los GC puede deberse a la inhibición de la proliferación celular, no estando relacionado a variaciones de sensibilidad de las células durante la activación.

En conclusión la inhibición de la blastogénesis en linfocitos humanos por GC no es consecuencia de la citolisis y depende de la potencia y concentración de la hormona, tiempo en que ésta se agrega y dosis del mitógeno.

Con respecto al efecto de la insulina en la activación linfocitaria, en los últimos años se puso en evidencia su posible importancia gracias a los trabajos que realizaron Helderman y Strom (157,158) sobre receptores de insulina en linfocitos activados. Teniendo en cuenta que la insulina es una hormona cuyos principales efectos son anabólicos, consideramos la posibilidad de que ella en alguna forma estimulara la síntesis de ADN en los linfocitos activados.

Los primeros experimentos realizados en presencia de insulina mostraron una gran variabilidad en la cantidad de ADN

sintetizado por las células estimuladas, lo que llevó a que en algunos casos el porcentaje de radioactividad incorporada fuera superior al de las células sin hormona pero en otros fuera igual o menor. Se consideró entonces la posibilidad de que dichas variaciones observadas se podían deber a que los individuos estaban en algunos casos en ayunas y en otros no, encontrándose por consiguiente en distintas condiciones metabólicas y endócrinas.

Está demostrado que como consecuencia del ayuno se produce una disminución de los niveles circulantes de glucosa así como de algunas hormonas tales como insulina (279), hormona folículo estimulante, luteinizante, de crecimiento y prolactina (280), en correspondencia a un menor consumo energético. Se sabe también que alteraciones en la dieta o estado nutricional pueden influenciar marcadamente las respuestas inmunes (281). Wing (282) ha demostrado un aumento en la actividad antimicrobiana de los macrófagos en el ratón, como consecuencia del ayuno.

Por tal razón, como se explicó anteriormente, para tratar de normalizar por lo menos las condiciones metabólicas en que se encontraban las células de los distintos individuos, se las incubó en buffer salino sin glucosa ni suero durante cuatro horas. Consideramos este tiempo adecuado, dado que Heaton y Gelehrter (283) demostraron un incremento en el transporte de AIB en células de hepatoma de rata luego de un ayuno

de aminoácidos de cuatro horas. En esas condiciones los linfocitos ayunados mantuvieron su viabilidad y capacidad de estimulación como los controles, y la insulina se comportó exactamente igual que en los experimentos anteriores.

Por otra parte los resultados obtenidos por nosotros, mostraron que la degradación de la hormona no sería tampoco responsable de la falta de efecto o inhibición del proceso mitogénico. No se descarta la posibilidad que un metabolito producto de la degradación de la insulina fuera el causante de tales efectos, a pesar de que se han descrito péptidos derivados de la insulina que potencian la acción de la misma (oxidación de la glucosa) en adipocitos de rata (284). Por otro lado, trabajos de Saltiel y col (285) han sugerido que ciertas acciones de la insulina pueden estar mediadas por factores químicos que son liberados de la membrana plasmática de las células "target" luego de incubación con la hormona. Concentraciones fisiológicas de la insulina en hígado de rata liberan dos factores, uno de los cuales estimula la piruvato deshidrogenasa mientras que el otro inhibe tanto esta enzima como la adenilato ciclasa, pudiendo estos factores estar involucrados en nuestro caso.

El efecto inhibitorio de la síntesis de ADN por acción de la insulina en linfocitos estimulados, solamente se observó cuando el mitógeno se usó en altas dosis (20 ul); esto permite

inferir que la insulina estimularía la acción autoinhibitoria. La acción estimuladora hallada también con 20 ul se debería a diferencias en la respuesta mitogénica de cada individuo. Muestra de ello es la tabla IV.5. en la que se observa que según el experimento, 20 ul de PHA pueden ser dosis óptima (exp 1) o supraóptimas (exp 3 y tabla IV.6.), indicando que aún con esta dosis de PHA la insulina podría estimular la síntesis de ADN, siempre y cuando el mitógeno no produzca la máxima respuesta.

Finalmente se demostró que la capacidad de la insulina para estimular la síntesis de ADN en linfocitos activados dependió, como en el caso de los GC, de la cantidad de mitógeno utilizada y además de la capacidad de las células de ser estimuladas.

Snow y col (170) cultivando linfocitos murinos en presencia de suero sintético (sustituto de suero fetal bovino) observaron que la insulina potencializaba el efecto mitogénico de la Con A pero no el de la PHA; es posible que estos autores hallan usado dosis supraóptimas del segundo mitógeno ya que en sus resultados no se observan diferencias en la incorporación de timidina con las dos dosis de PHA utilizadas. Por otra parte, mientras el índice de estimulación con Con A fue bajo (IE = 7) el de PHA fue mayor (IE = 43). Estos resultados estarían de acuerdo con nuestra observación en que existe correlación entre índice de estimulación y potenciación por la insu-

lina del efecto mitogénico.

Es sabido que la insulina sola o en combinación con otras hormonas ejercen efectos diversos sobre procesos metabólicos. En este capítulo se demuestra que la insulina puede ejercer un efecto antagónico sobre la inhibición de la activación linfocitaria producida por cortisol y dexametasona. Dicho efecto antagónico es comparable al descrito previamente en otros procesos celulares. Por ejemplo, la acción de la insulina y los GC son antagónicos sobre el transporte de aminoácidos y la degradación de proteínas en células de hepatoma (286), y sobre la incorporación de nucleósidos a macromoléculas y en la actividad de la timidina kinasa en células de cáncer mamario humano (287).

De los resultados presentados se podría concluir que la insulina potencializa el efecto de la PHA solamente cuando existen concentraciones mitogénicas subóptimas en el medio de cultivo, ya sea debido a bajas dosis del mitógeno o a la presencia de GC como inhibidor, siempre y cuando este efecto sea menor del 60%.

Strom y col (168) han demostrado que la insulina incrementa la síntesis de ADN en cultivos de linfocitos humanos allogeneicos en un medio libre de suero fetal y en presencia de suero sustituto. Estos autores sugieren que esta acción es consecuencia de la interacción específica de la insulina con los receptores en el linfocito activado. Han demostrado también

que la insulina es capaz de aumentar la capacidad citolítica de las células T killer en la rata (288), y postulan que la habilidad de la insulina para incrementar específicamente la función citotóxica de los linfocitos T y la proliferación de linfocitos en cultivo mixto, residiría en la capacidad de esta hormona de estimular el metabolismo intermedio en los linfocitos activados (167). Con nuestros resultados no podemos descartar que la insulina pueda actuar sobre el linfocito activado, pero postulamos que una primera acción sería a través de las células accesorias.

Está ampliamente aceptado el requerimiento de células accesorias para la proliferación de los linfocitos T en respuesta a mitógenos o antígenos (289,290). La inducción de la proliferación de las células T y la formación de células efectoras requiere diversas señales (291). La primera señal involucra la unión del antígeno o mitógeno a la membrana del linfocito que induce la liberación por los monocitos de un importante factor, la interleuquina-1 (292,293), que actúa sobre las células T helper para liberar otro factor llamado interleuquina-2 (294,295). Dicho factor actúa sobre las células T, que responden, proliferan y se diferencian en células T efectoras (296).

Snyder y col (297) y Stošić-Grujičić y col (298) demostraron que los GC ejercen su efecto inmunosupresor a través de la producción de IL-1 por el monocito. Por otra parte, el

monocito no sólo posee receptores de insulina (156) sino que Beck-Nielsen (166) demostró que dicha hormona activa el metabolismo de hidratos de carbono en esas células. En base a ellos en esta tesis se postula que la acción antagónica observada entre insulina y glucocorticoides en linfocitos activados se ejercería sobre la producción de IL-1, paso que modularía las etapas que se desencadenan posteriormente.

No se descartan otros mecanismos ya que se ha descrito que el monocito además de segregar IL-1 produce una diversidad de factores que participan en los mecanismos de defensa del organismo regulando funciones de otras células (299). El efecto de la insulina también podría ser a través de uno de estos factores que regulan la sensibilidad a los GC (300).

La sensibilidad del sistema inmune a los glucocorticoides y el efecto antagónico de la insulina sobre su acción inhibitoria, sugiere que ambas hormonas pueden jugar un rol importante en la regulación de la respuesta inmune, y podrían ser uno de los factores que producen las deficiencias inmunitarias, que se encuentran en algunas enfermedades endócrinas como la Diabetes Mellitus y la desnutrición.

SUMARIO Y CONCLUSIONES

Como se ha expresado a lo largo de esta tesis, actualmente se conoce bien el efecto de los GC sobre el timo tanto "in vivo" como "in vitro", pero sin embargo el efecto de la insulina sobre estas células está menos estudiado.

El primer paso de este trabajo fue estudiar el efecto de la falta de insulina (diabetes inducida por Stz) sobre el timo de ratas intactas o adrenalectomizadas. Nuestros resultados demostraron que la disminución de peso de timo observada en las ratas diabéticas, con o sin adrenales, está asociada a una menor cantidad de timocitos, especialmente los GC-sensibles o timocitos corticales. La involución del timo en los animales AxD, sugiere que parte de este efecto es consecuencia de la falta de insulina y no se la puede atribuir como en el animal diabético, solamente a la presencia de altos niveles de GC circulantes.

Se estudió además la sensibilidad a los GC en los timocitos de ratas AxD. Se encontró que en animales Ax la diabetes produce un aumento en la K_d del receptor de GC, indicando una menor afinidad de los GC por su receptor. El número de receptores no se alteró, siendo el mismo muy variable en ambos grupos de animales.

La menor afinidad del receptor por su hormona se correlaciona con el menor efecto inhibitorio producido por las concentraciones más bajas de Dex y B sobre la incorporación de uridina-³H en estos timocitos, sugiriendo una menor sensibilidad

a la hormona producida por la ausencia de insulina. Esta menor sensibilidad se podría deber a posibles cambios producidos en el receptor de GC como consecuencia de las alteraciones metabólicas y/o endócrinas producidas en la diabetes.

Por otra parte, la ausencia de receptores de insulina en timocitos de ratas adultas Axy AxD se correlaciona con la falta de efecto "in vitro" de la insulina en el transporte de AIB. Sin embargo hubo efecto "in vivo" de la insulina; la inyección de 1U de la hormona a estos animales además de hipoglucemia produjo en los timocitos un incremento significativo del transporte de AIB, lo que sugiere una posible correlación entre ambos fenómenos.

De estos resultados se puede deducir que dado que los timocitos de ratas poseen receptores para GC la acción ejercida por estos esteroides es directa a través de su receptor; en cambio la acción ejercida por la insulina sería indirecta ya que estas células no poseen receptores para dicha hormona.

Considerando que en el animal adulto el timo no es el órgano más importante en la regulación de la respuesta inmune, y en base a lo presentado anteriormente, se estudió la acción de los GC y la insulina sobre los linfocitos humanos circulantes dado que en estas células se han encontrado receptores para GC y los receptores para insulina están presentes en las células accesorias y en los linfocitos activados.

En concordancia con los resultados de otros investigadores, el cortisol y la dexametasona inhibieron la acción mitogénica de la PHA en los linfocitos humanos, dependiendo este efecto no solamente de la potencia y concentración hormonal sino también de la dosis del mitógeno utilizada. En ninguno de estos casos la lisis celular fue causa de la inhibición de la síntesis de ADN.

Con respecto al efecto de la insulina sobre la activación linfocitaria, se demostró que la insulina era capaz de estimular la síntesis de ADN en linfocitos activados solamente cuando existen concentraciones mitogénicas subóptimas en el medio de cultivo. Por otro lado concluimos que la insulina estimularía la acción autoinhibitoria de la PHA que se produce en dosis supraóptimas. Además se demostró que la insulina puede ejercer un efecto antagónico sobre la inhibición de la activación linfocitaria producida por el cortisol y la dexametasona, siempre que la inhibición producida por el GC sea menor de 60%.

En esta tesis se postula que la acción antagónica observada entre GC e insulina en linfocitos activados se ejercería sobre el monocito, alterando la producción de IL-1, dado que es inhibida por los GC y el monocito además de poseer receptores para insulina es sensible a ella.

La disminución del efecto inhibitorio de los GC en células linfoides observado en esta tesis, se ha demostrado en

timocitos de ratas AxD y en linfocitos humanos estimulados en presencia de insulina. Ambos efectos, antagónicos a la acción de los GC, responderían a diferentes mecanismos. En el primer caso, la deficiencia crónica de insulina causaría en forma indirecta un aumento en la K_d del receptor de GC. En el segundo caso, la insulina en forma directa aumentaría la secreción de IL-1. Cualquiera de los dos mecanismos contrarestarían la acción inmunosupresora de los GC circulantes.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Miller, J.F.A.P.: Experimental thymology has come of age. Thymus 1: 3-25, 1979.
- 2.- Miller, J.F.A.P., Osoba, D.: Current concepts of the immunological function of the thymus. Physiol. Rev. 47: 437-520, 1967.
- 3.- Miller, J.F.A.P.: Immunological function of the thymus. Lancet 2: 748-749, 1961.
- 4.- Simpson, J.G., Gray, E.S., Beck, J.S.: Age involution in the normal adult human thymus. Clin. Exp. Immunol. 19: 261-265, 1975.
- 5.- Singh, J., Singh, A.K.: Age-related changes in human thymus. Clin. Exp. Immunol. 37: 507-511, 1979.
- 6.- Pora, E.A., Toma, V.: L'involution normale et accidentelle du thymus. Ann. d'Endocrinologie (Paris) 30: 519-531, 1969.
- 7.- Bellamy, D., Mohamed, K.: A comparative study of age involution of the bursa of Fabricius and thymus in birds. Thymus 4: 107-114, 1982.
- 8.- Weiss, L.: Timo, en Histología (Ed. R.O.Grrep) Editorial "El Ateneo" Bs. As. pp 363-380, 1970.
- 9.- Duijvestijn, A.M., Hoefsmit, E.C.M.: Ultrastructure of the rat thymus: the microenvironment of T-lymphocyte maturation. Cell. Tissue Res. 218: 279-292, 1981.

- 10.- Lobach, D.F., Scearce, R.M., Haynes, B.F.: The human thymic microenvironment. Phenotypic characterization of Hassall's bodies with the use of monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 134: 250-257, 1985.
- 11.- Baroni, C.D., Valtieri, M., Stoppocciaro, A., Ruco, L.P., Uccini, S., Ricci, C.: The human thymus in ageing: histologic involution paralleled by increased mitogen response by enrichment of OK T3⁺ lymphocytes. *Immunology* 50: 519-528, 1983.
- 12.- Kung, P.C., Golstein, G., Reinherz, E.L., Schlossman, S.F.: Monoclonal antibodies defining distinctive T cell surface antigens. *Science* 206: 347-349, 1979.
- 13.- Stutman, O.: Cellular and humoral requirements for T-cell development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 332: 123-127, 1979.
- 14.- Shortman, K.: T-cell development in the thymus. *Nature* 309: 583-584, 1984.
- 15.- Trainin, N., Pecht, M., Handzel, Z.T.: Thymic hormones: inducers and regulators of the T-cell system. *Immunology Today* 4: 16-21, 1983.
- 16.- Goldstein, A.S., Low, T.L.K., Thurman, G.B., Zatz, M.M., Hall, N., Chen, J., Hu, S.K., Naylor, P.B., Clure, J.E.: Current status of thimosin and other hormones of the thymus gland. *Recent Prog. Horm. Res.* 37: 369-385, 1981.
- 17.- Bach, J.F., Dardenne, M., Pleau, J.M., Bach, M.A.: Isolation, biochemical characteristics, and biological activity of a circulating thymic hormone in the mouse and in the human. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 249: 186-210, 1975.

- 18.- Craddock, C.G., Longmire, R., Mc Millam, R.: Lymphocytes and the immune response. *New Engl. J. Med.* 285: 324-331, 1971.
- 19.- Daniels, J.C., Ritzman, S.E., Levin, W.C.: Lymphocytes: morphological developmental and functional characteristics in health, disease and experimental study. An analytical review. *Tex. Rep. Biol. Med.* 26: 5-92, 1968.
- 20.- Raff, M.C.: T and B lymphocytes in mice studied by using antisera against surface markers. *Am. J. Path.* 65: 467-478, 1971.
- 21.- Cooper, M.D., Perey, D.Y., Mc Kneally, M.F., Gabrielsen, A.E., Sutherland, D.E.R., Good, R.A.: A mammalian equivalent of the avian bursa of Fabricius. *Lancet* 1: 1388-1391, 1966.
- 22.- Perey, D.Y., Frommei, D., Mong, R., Good, R.A.: The mammalian homologue of the avian bursa of Fabricius. II. Extirpation, lethal X-irradiation and reconstitution in rabbits. Effects on humoral immune responses, immunoglobulin, and lymphoid tissues. *Lab. Invest.* 22: 212-227, 1970.
- 23.- Eugui, E.M., Braun, M., Bachman, A.E.: Inmunidad celular. Células que participan en la respuesta inmune. En *Inmunología e Inmunquímica* (Ed. R.A.Margni) Editorial Médica Panamericana. Bs. As. pp 27-44, 1982.
- 24.- Scollay, R.G., Butchner, E.C., Weissman, I.L.: Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur. J. Immunol.* 10: 210-218, 1980.

- 25.- Raff, M.C., Cantor, H.: Subpopulations of thymus cells and thymus-derived lymphocytes. In Progress in Immunology (Ed. B. Amos) "Academic Press" New York pp 83-93, 1971.
- 26.- Schlesinger, M.: Anti- θ antibodies for detecting thymus-dependent lymphocytes in the immune response of mice to SRBC. Nature (London) 226: 1254-1256, 1970.
- 27.- Giraudo Conesa, L.C., Braun, M., Bachman, A.C.: Maduración y función de los linfocitos T y B. Acta Physiol. Latinoam. 23: 371-395, 1973.
- 28.- Shou, L., Schwartz, S.A., Good, R.A.: Suppressor cell activity after Concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors. J. Exp. Med. 143: 1100-1110, 1976.
- 29.- Moretta, L., Webb, S.R., Grossi, C.E., Lydyard, P.M., Cooper, M.D.: Functional analysis of two human T-cell subpopulations: Help and suppression of B-cell response by T cells bearing receptors for IgM or IgG. J. Exp. Med. 146: 184-200, 1977.
- 30.- Kehri, J.H., Muraguchi, A., Butler, J.L., Falkoff, R.J.M., Fauci, A.S.: Human B cell activation, proliferation and differentiation. Immunol. Rev. 78: 75-96, 1984.
- 31.- Thorn, G.W.: Clinical considerations in the use of corticosteroids. New Engl. J. Med. 274: 775-781, 1966.
- 32.- Long, D.A.: The influence of corticosteroids on immunological responses to bacterial infections. Int. Arch. Allergy 10: 5-12, 1957.

- 33.- Pfahl, M., Kelleher, R.J., Bourgeois, S.: General features of steroid resistance in lymphoid cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* 10: 193-207, 1978.
- 34.- Hollander, N., Chin, Y.W.: "In vitro" binding of (1,2³H) cortisol by a substrate in the supernatant fraction of P 1798 mouse lymphosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25: 291-297, 1966.
- 35.- Sibley, C.H., Tomkins, G.M.: Mechanisms of steroid resistance. *Cell* 2: 221-227, 1974.
- 36.- Duval, D., Dausse, J.P., Dardenne, M.: Glucocorticoid receptors in corticosensitive and corticoresistant thymocyte subpopulations. I. Characterization of glucocorticoid receptors and isolation of a corticoresistant subpopulation. *Biochim. Biophys. Acta* 451: 82-91, 1976.
- 37.- Selye, H.: Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Br. J. Exper. Path.* 17: 234-248, 1936.
- 38.- Ingle, D.J.: Atrophy of the thymus in normal and hypophysectomized rats following administration of cortin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 38: 443-444, 1938.
- 39.- Houssay, B., del Castillo, E.B., Pinto, A.: Acción de la suprarrenalectomía sobre el timo y los ganglios. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 17: 26-39, 1941.
- 40.- Jaffe, L.H.: The influence of the suprarenal gland on the Thymus. *J. Exp. Med.* 40: 325, 1924.

- 41.- Rapela, C.E.: Relación de la glándula suprarenal con el timo. Acción del acetato de desoxicorticosterona sobre las glándulas adrenales. El Ateneo. Bs. As. 1944.
- 42.- Boinet, E.: Recherches experimentales sur les fonctions des capsules surrénales. C.R. Soc. Biol. París 51: 671, 1899.
- 43.- Ishidate, M., Metcalf, D.: The pattern of lymphopoiesis in the mouse thymus after cortisone administration or adrenalectomy. Aust. J. Exp. Biol. 41: 637-649, 1963.
- 44.- Dougherty, T.F., White, A.: Effect of pituitary adrenotropic hormone on lymphoid tissue. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 53: 132-133. 1943.
- 45.- Dougherty, T.F.: Effect of hormone on lymphatic tissue. Physiol. Rev. 32: 379-401, 1952.
- 46.- Blomgren, H., Anderson, B.: Characteristics of the immunocompetent cells in the mouse thymus: cell population changes during cortisone-induced atrophy and subsequent regeneration. Cell. Immunol. 1: 545-560, 1971.
- 47.- Kelly, F.J., Goldspink, D.F.: Age-related growth and protein turnover in the thymus of normal and glucocorticoid-treated rats. Eur. J. Biochem. 138: 623-627, 1984.
- 48.- Duval, D., Dardenne, M., Dausse, J.P., Homo, F.: Glucocorticoid receptors in corticosensitive and corticoresistant thymocyte subpopulations. II. Studies with hydrocortisone-treated mice. Biochim. Biophys. Acta 496: 312-320, 1977.

- 49.- Esteban, J.N.: The differential effect of hydrocortisone on the short-lived small lymphocytes. *Anat. Record* 162: 349-356, 1968.
- 50.- Morita, Y., Munck, A.: Effect of glucocorticoid "in vivo" and "in vitro" on net glucose uptake and amino acid incorporation by rat thymus cells. *Biochim. Biophys. Acta* 93: 150-157, 1964.
- 51.- Munck, A.: Glucocorticoid inhibition of glucose uptake by peripheral tissue: old and new evidence, molecular mechanism, and physiological significance. *Perspect. Biol. Med.* 14: 265-288, 1971.
- 52.- Boyett, J.D., Hofert, J.F.: Studies concerning the inhibition of glucose metabolism in thymus lymphocyte by cortisol and epinephrine. *Endocrinology* 91: 233-239, 1972.
- 53.- Cidlowski, J.A. Concanavalin A induced glucocorticoid resistance in rat thymocytes in relation to glucose metabolism and glucocorticoid receptors. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 67: 463-470, 1975.
- 54.- Junker, K.: Binding of dexamethasone and inhibition of transport of 3-O-methylglucose in rat thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 673: 517-526, 1981.
- 55.- Makman M.H., Dvorkin, B., White, A.: Alterations in protein and nucleic acid metabolism of thymocytes produced by adrenal steroids "in vitro". *J. Biol. Chem.* 241: 1646-1648, 1966.

- 56.- Makman, M.H., Nakagawa, S., White, A.: Studies of the mode of action of adrenal steroids on lymphocytes. *Rec. Prog. Horm. Res.* 23: 195-227, 1967.
- 57.- Young, D.A.: Glucocorticoid action on rat thymus cells. I. Interrelationships between carbohydrate, protein and adenine nucleotide metabolism and cortisol effects on these functions "in vitro". *J. Biol. Chem.* 244: 2210-2217, 1969.
- 58.- Young, D.A.: Glucocorticoid action on rat thymus cells. II. Interrelationships between ribonucleic acid and protein metabolism and between cortisol and substrate effects on these metabolic parameters "in vitro" *J. Biol. Chem.* 245: 2747-2752, 1970.
- 59.- Foley, J.E., Jeffries, M., Munck, A.: Glucocorticoid effects on incorporation of lipid and protein precursors into rat thymus cell fractions. *J. Steroid Biochem.* 12: 231-243, 1980.
- 60.- Gagne, D., Homo, F., Duval, D.: Steroid-induced inhibition of nucleoside uptake in isolated mouse thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 603: 27-35, 1980.
- 61.- Duval, D., Durant, S., Homo-Delarche, F.: Effect of anti-glucocorticoid on dexamethasone inhibition of uridine incorporation and cell lysis in isolated mouse thymocytes. *J. Steroid Biochem.* 19:168, Suppl. 1983.
- 62.- Makman, M.H., Dvorkin, B., White, A.: Influence of cortisol on the utilization of precursors of nucleic acids and protein by lymphoid cells "in vitro". *J. Biol. Chem.* 243: 1485-1497, 1968.

- 63.- Makman, M.H., Dvorkin, B., White, A.: Evidence for induction by cortisol "in vitro" of a protein inhibitor of transport and phosphorylation processes in rat thymocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 1269-1273, 1971.
- 64.- Baran, D.T., Peck, W.A., Frengley, P.A., Lichtman, M.A.: Cortisol-induced inhibition of amino acid transport in thymic lymphocytes: kinetics parameters; relation to ATP levels and protein synthesis; and specificity. Biochim. Biophys. Acta 307: 627-635, 1973.
- 65.- Borthwick, N.M., Bell, P.A.: Early glucocorticoid-dependent stimulation of RNA polymerase B in rat thymus cells. FEBS Lett. 60: 396-399, 1975.
- 66.- Bell, P.A., Borthwick, N.M.: Glucocorticoid effect on DNA-dependent RNA polymerase activity in rat thymus cells. J. Steroid Biochem. 7: 1147-1150, 1976.
- 67.- Turnell, R.W., Clarke, L.H., Burton, A.F.: Studies on the mechanism of corticosteroid-induced lymphocytolysis. Cancer Res. 33: 203-212, 1973.
- 68.- Seillan, C., Duval, D., Homo, F.: Effect of dexamethasone on non-esterified fatty acid metabolism in isolated mouse thymocytes. J. Steroid Biochem. 14: 829-833, 1981.
- 69.- Schrek, R.: Citotoxic action of hormones of the adrenal cortex according to the method of unstained cell counts. Endocrinology 45: 317-334, 1949.

- 70.- Kaiser, N., Edelman, I.S.: Calcium dependence of glucocorticoid-induced lymphocytolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74: 638-642, 1977.
- 71.- Cohen, J.J., Duke, R.C.: Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. J. Immunol. 132: 38-42, 1984.
- 72.- Durant, S., Seillan, C., Duval, D., Homo-Delarche, F.: Role of adrenal hormones and prostaglandins in the control of mouse thymocytes lysis. Int. J. Immunopharmac. 6: 223-232, 1984.
- 73.- Alvarez, M.R., Truitt, A.J.: Rapid nuclear cytochemical changes induced by dexamethasone in thymocytes of adrenalectomized rats. Expl. Cell. Res. 106: 105-110, 1977.
- 74.- Wyllie, A.H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284: 555-556, 1980.
- 75.- Thomas, N., Bell, P.A.: Glucocorticoid-induced cell-size changes and nuclear fragility in rat thymocytes. Mol. Cell. Endocrinol. 22: 71-84, 1981.
- 76.- Thomas, N., Edwards, J.L., Bell, P.A.: Studies of the mechanism of glucocorticoid-induced pyknosis in isolated rat thymocytes. J. Steroid Biochem. 18: 519-524, 1983.
- 77.- Munck, A., Leung, K.: Glucocorticoid receptors and mechanism of action. In Receptors and mechanism of action of steroid hormones (Ed. J.R.Pasqualini) Marcel Dekker New York Part II pp 311-397, 1977.

- 78.- Lan, N.C., Karin, M., Nguyen, T., Weisz, A., Birnbaum, M.J., Eberhardt, N.L., Baxter, J.D.: Mechanism of glucocorticoid hormone action. *J. Steroid Biochem.* 20: 77-88, 1984.
- 79.- O'Malley, B.W.: Steroid hormone action in eucaryotic cells. *J. Clin. Invest.* 74: 307-312, 1984.
- 80.- Fauci, A.S., Dale, D.C.: The effect of hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocytes. *Blood* 46: 235-243, 1975.
- 81.- Fauci, A.S., Dale, D.C., Balow, J.E.: Glucocorticoid therapy: mechanisms of action and clinical considerations. *Ann. Intern. Med.* 84: 304-315, 1976.
- 82.- Parrilo, J.E., Fauci, A.S.: Mechanism of glucocorticoid action on immune processes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 19: 179-201, 1979.
- 83.- Fauci, A.S.: Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of glucocorticoid. In *Glucocorticoid Hormone Action* (Ed. J.D. Baxter and G.G. Rousseau) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pp 449-465, 1979.
- 84.- Homo, F., Duval, D., Thierry, Ch., Serrou, B.: Human lymphocyte subpopulations: effects of glucocorticoids "in vitro". *J. Steroid Biochem.* 10: 609-613, 1979.
- 85.- Schrek, R.: Cytotoxicity of adrenal cortex hormones on normal and malignant lymphocytes of man and rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 108: 328-332, 1961.

- 86.- Haynes, B.F., Fauci, A.S.: The differential effect of "in vitro" hydrocortisone on the kinetics of subpopulations of human peripheral blood thymus-derived lymphocytes. J. Clin. Invest. 61: 703-707, 1978.
- 87.- Slade, J.D., Hepburn, B.: Prednisone-induced alterations of circulating human lymphocyte subsets. J. Lab. Clin. Med. 101: 479-487, 1983.
- 88.- Janossy, G., Greaves, M.F.: Lymphocyte activation. I. Responses of T and B lymphocytes to phyto mitogens. Clin. Exp. Immunol. 9: 483-498, 1971.
- 89.- Wedner, H.J., Parker, C.W.: Lymphocyte activation. Prog. Allergy 20: 195, 1976.
- 90.- Hadden, J.W., Hadden, E.M., Haddox, M.K., Goldberg, N.D.: Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate: a possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 69: 3024-3027, 1972.
- 91.- Klimpel, G.R., Byus, C.V., Russell, D.H., Lucas, D.O.: Cyclic AMP-dependent protein kinase activation and the induction of ornithine decarboxylase during lymphocyte mitogenesis. J. Immunol. 123: 817-824, 1979.
- 92.- Nowell, P.C.: PHA: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res. 20: 462-466, 1960.
- 93.- Mueller, G.C., Le Mahieu, M.: Induction of ribonucleic acid synthesis in human leukocytes by Phytohemagglutinin. Biochim. Biophys. Acta 114: 100-107, 1966.

- 94.- Bernheim, J.L., Dorian, R.E., Mendelsohn, J.: DNA synthesis and proliferation of human lymphocytes "in vitro". I. Cell kinetics of response to phytohemagglutinin. *J. Immunol.* 120: 955-961, 1978.
- 95.- Rauch, H.C., Loomis, M.E., Johnson, M.E., Favour, C.B.: "In vitro" suppression of polymorphonuclear leukocyte and lymphocyte glycolysis by cortisol. *Endocrinology* 68: 375-385, 1961.
- 96.- Nowell, P.C.: Inhibition of human leukocyte mitosis by prednidolone "in vitro". *Cancer Res.* 21: 1518-1521, 1961.
- 97.- Tormey, D.C.; Fudenberg, H.H., Kamin, R.M.: Effect of prednisolone on synthesis of DNA and RNA by human lymphocyte "in vitro". *Nature (London)* 213: 281-282, 1967.
- 98.- Caron, G.A.: Prednisolone inhibition of DNA synthesis by human lymphocytes induced "in vitro" by Phytohemagglutinin. *Int. Arch. Allergy* 32: 191-200, 1967.
- 99.- Ono, T., Terayama, H., Takakeu, F., Nakao, K.: Inhibitory effect of hydrocortisone upon the phytohemagglutinin-induced RNA-synthesis in human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 161: 361-367, 1968.
- 100.- Darzynkiewicz, Z., Pieńkowski, M.: Effect of prednisolone on RNA synthesis in human lymphocytes stimulated by PHA. *Exp. Cell Res.* 54: 289-292, 1969.
- 101.- Yu. D.T.Y.: Effect of corticosteroids on lymphocyte activation. *Blood* 49: 873-881, 1977.

- 102.- Munck, A., Guyre, P.M., Holbrook, N.J.: Physiological functions of glucocorticoid in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews* 5: 25-44, 1984.
- 103.- Guyre, P.M., Bodwell, J.E., Munck, A.: Glucocorticoid action on lymphoid tissue and the immune system. Physiologic and therapeutic implications. *Hormones and cancer*. (Ed. E. Gurpide, R. Calandra, C. Levy, R.J. Soto) New York pp 181-194, 1984.
- 104.- Goodwin, J.S., Messner, R.P., Williams, R.C.Jr.: Inhibitors of T-cell mitogenesis: effect of mitogen dose. *Cell. Immunol.* 45: 303-308, 1979.
- 105.- Neifeld, J.P., Lippman, M.E., Tormey, D.C.: Steroid hormone receptors in normal human lymphocytes. Induction of glucocorticoid receptor activity by Phytohemagglutinin stimulation. *J. Biol. Chem.* 252: 2972-2977, 1977.
- 106.- Smith, K.A., Crabtree, G.R., Kennedy, S.J., Munck, A.: Glucocorticoid receptors and glucocorticoid sensitivity of mitogen stimulated and unstimulated human lymphocytes. *Nature* 267: 523-525, 1977.
- 107.- Crabtree, G.R., Munck, A., Smith, K.A.: Glucocorticoid and lymphocytes. I. Increased glucocorticoid receptors levels in antigen-stimulated lymphocytes. *J. Immunol.* 124: 2430-2435, 1980.
- 108.- Lippman, M.E., Barr, R.D.: Glucocorticoid receptors in purified subpopulations of human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 118: 1977-1981, 1977.

- 109.- Gillis, S., Crabtree, G.R., Smith, K.A.: Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. I. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. J. Immunol. 123: 1624-1631, 1979.
- 110.- Crabtree, G.R., Gillis, S., Smith, K.A., Munck, A.: Mechanism of glucocorticoid-induced immunosuppression inhibitory effects on expression of Fc receptors and production of T-cell growth factor. J. Steroid Biochem. 12: 445-449, 1980.
- 111.- Orci, L.: Macro- and micro-domain in the endocrine pancreas. Diabetes 31: 538-565, 1982.
- 112.- Jefferson, L.S.: Role of insulin in the regulation of protein synthesis. Diabetes 29: 487-496, 1980.
- 113.- Scow, R.O., Chernick, S.S.: Hormonal control of protein and fat metabolism in the pancreatectomized rat. Recent Prog. Horm. Res. 16: 497-545, 1960.
- 114.- Houssay, B.A., Biasotti, A.: La diabetes pancreática de los perros hipofisoprivos. Rvta. Soc. Argent. Biol. 6: 251-296, 1930.
- 115.- Long, C.N.H., Lukens, F.D.W.: The effects of adrenalectomy and hypophysectomy upon experimental diabetes in the cat. J. Exp. Med. 63: 465, 1936.
- 116.- Luft, R., Guillemin, R.: Growth hormone and Diabetes in man. Old concepts. New implications. Diabetes 23: 783-787, 1974.

- 117.- Engel, F.L.: Functional interrelationships between the anterior pituitary and adrenal cortex in intermediary metabolism. *Prog. Allergy* 4: 227, 1954.
- 118.- Landgraf, R., Landgraf-Leura, M.M.C., Weissman, A., Horl, R., von Werder, K., Scriba, P.C.: Prolactin: a diabetogenic hormone. *Diabetologia* 13: 99-104, 1977.
- 119.- Unger, R.H.: Diabetes and the alpha cell. *Diabetes* 25: 136-151, 1976.
- 120.- Thornton, G.F.: Infection and diabetes. *Med. Clin. N. Am.* 55: 931-938, 1971.
- 121.- Martin, S.P., Mc Kinney, G.R., Green, R., Becker, C.: The influence of glucose, fructose and insulin on the metabolism of leukocytes of healthy and diabetic subjects. *J. Clin. Invest.* 32: 1171-1174, 1953.
- 122.- Bybee, J.D., Rogers, D.E.: The phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes obtained from patients with Diabetes Mellitus. *J. Lab. Clin. Med.* 64: 1-13, 1964.
- 123.- Mowat, A.G., Baum, J.: Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with Diabetes Mellitus. *New Engl. J. Med.* 284: 621-627, 1971.
- 124.- Bagdade, J.D., Root, R.K., Bulger, R.J.: Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled Diabetes. *Diabetes* 23: 9-15, 1974.

- 125.- Plouffe, J.F., Silva, J.Jr., Fekety, R., Allen, J.L.: Cell-mediated immunity in Diabetes Mellitus. *Infection and Immunity*. 21: 425-429, 1978.
- 126.- Mac Cuish, A.C., Urlanish, S.J., Campbell, C.T.: PHA transformation and circulating lymphocyte subpopulations in insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes* 23: 708-712, 1974.
- 127.- Ragah, A.H., Hazlett, B., Cowan, D.H.: Response of peripheral blood lymphocytes from patients with Diabetes Mellitus to PHA and *Candida albicans* antigens. *Diabetes* 21: 906-907, 1972.
- 128.- Rosen, F.S.: The lymphocyte and the thymus gland-congenital and hereditary abnormalities. *New Engl. J. Med.* 279: 643-648, 1968.
- 129.- Chandy, K.G., Charles, A.M., Kershner, A., Buckingham, B., Waldeck, N., Gupta, S.: Autologous mixed lymphocyte reaction in man: XV. Cellular and molecular basis of deficient autologous mixed lymphocyte response in insulin-dependent Diabetes Mellitus. *J. Clin. Immunol.* 4: 424-428, 1984.
- 130.- Zier, K.S., Leo, M.M., Spielman, R.S., Baker, L.: Decreased synthesis of interleukin-2 in insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 33: 552-555. 1982.
- 131.- Geisler, C., Almdal, T., Bennedsen, J., Rhodes, J.M., Kølendorf, K.: Monocyte functions in Diabetes Mellitus. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C* 90: 33-37, 1982.

- 132.- Buschard, K., Madshad, S., Rygaard, J.: Depressed suppressor cell activity in patients with newly diagnosed insulin-dependent Diabetes Mellitus. Clin. Exp. Immunol. 41: 25-32, 1980.
- 133.- Helderman, J.H., Raskin, P.: The T lymphocyte insulin receptor in Diabetes and obesity. An intrinsic binding defect. Diabetes 29: 531-557, 1980.
- 134.- Fabris, N., Piantanelli, L.: Differential effect of pancreatectomy on humoral and cell-mediated immunity. Clin. Exp. Immunol. 28: 315-322, 1977.
- 135.- Chi, D.S., Berry, D.L., Dillon, K.A., Arbogast, B.W.: Inhibition of "in vitro" lymphocyte response by streptozotocin-induced diabetic rat serum. A function of very-low-density lipoprotein. Diabetes 31: 1098-1104, 1982.
- 136.- Delespesse, G., Duchateau, J., Bastenie, P.A., Lauvaux, J.P., Collet, H., Govaerts, A.: Cell-mediated immunity in Diabetes Mellitus. Clin. Exp. Immunol. 18: 461-467, 1974.
- 137.- Fernandes, G., Handwerger, B.S., Junier, E.J., Brown, D.M.: Immune response in the mutant diabetic C57 BL/Ks db+ mouse. Discrepancies between "in vitro" and "in vivo" immunological assays. J. Clin. Invest. 61: 243-250, 1978.
- 138.- Mandel, M.A., Mahmoud, A.A.F.: Impairment of cell-mediated immunity in mutation diabetic mice (db/db). J. Immunol. 120: 1375-1377, 1978.

- 139.- Czech, M.P.: Molecular basis of insulin action. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 359-384, 1977.
- 140.- Goldfine, I.D.: Insulin receptors and the site of action of insulin. *Life Sciences* 23: 2639-2648, 1978.
- 141.- Denton, R.M., Brownsey, R.W., Belsham, G.J.: A partial view of the mechanism of insulin action. *Diabetologia* 21: 347-362, 1981.
- 142.- Desbuquois, B., Cuatrecasas, P.: Insulin receptors. *Ann. Rev. Med.* 24: 233-240, 1973.
- 143.- Czech, M.P.: New perspectives on the mechanism of insulin action. *Rec. Prog. Horm. Res.* 40: 347-377, 1984.
- 144.- Goldfine, I.D.: Does insulin need a second messenger? *Diabetes* 26: 148-152, 1977.
- 145.- Gorden, P., Carpentier, J-L, Moule, M., Orci, L.: Direct demonstration of insulin receptor internalization. *Diabetes* 31: 659-662, 1982.
- 146.- Murphy, R.F., Bisaccia, E., Cantor, Ch.R., Berger, C., Edelson, R.L.: Internalization and acidification of insulin by activated human lymphocytes. *J. Cell. Physiol.* 121: 351-356, 1984.
- 147.- Strauss, D.S.: Growth-stimulatory actions of insulin "in vitro" and "in vivo". *Endocrine Rev.* 5: 356-369, 1984
- 148.- Hershko, A., Mamont, P., Shields, R., Tomkins, G.M.: Pleiotypic response. *Nature New Biology* 232: 206-211, 1971.

- 149.- Jiménez de Asúa, L., Surian, E.S., Flawia, M.M., Torres, H.N.: Effect of insulin on the growth pattern and adenylate cyclase activity of BHK fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70: 1388-1392, 1973
- 150.- Pledger, W.J., Gardner, R.M., Epstein, P.M., Thompson, W.J., Strada, S.J., Wlodyka, L.: Cell cycle traverse and macromolecular synthesis in BHK fibroblasts as affected by insulin. Expl. Cell Res. 118: 389-394, 1979.
- 151.- Hollemberg, M.D., Cuatrecasas, P.: Insulin and epidermal growth factor. Human fibroblasts receptors related to deoxiribonucleic acid synthesis and amino acid uptake J. Biol. Chem. 250: 3845-3853, 1975.
- 152.- Boyum, A.: Isolation of leukocytes from human blood. Further observations. Scand. J. Clin. Invest. 21 suppl.97 31-50, 1968.
- 153.- Gavin, J.R., Roth, J., Jen, P., Freychet, P.: Insulin receptors in human circulating cells and fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69: 747-751, 1972.
- 154.- Krug, J., Krug, F., Cuatrecasas, P.: Emergence of insulin receptors on human lymphocytes during "in vitro" transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69: 2604-2608, 1972.
- 155.- Schwartz, R.H., Bianco, A.R., Handwerger, B.S., Kahn, C.R.: Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin binding cells in preparations of human peripheral blood mononuclear leukocytes: Implications for studies of insulin-resistant states in man. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72: 474-478, 1975.

- 156.- Beck-Nielsen, H., Pedersen, O., Kragballe, K., Schwartz-Sørensen, N.: The monocyte as a model for the study of insulin receptors in man. *Diabetologia* 13: 563-569, 1977.
- 157.- Helderman, J.H., Strom, T.B.: Role of protein and RNA synthesis in the development of insulin binding sites on activated thymus-derived lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 254: 7203-7207, 1979.
- 158.- Helderman, J.H., Strom, T.B.: Specific insulin binding sites on T and B lymphocytes as a marker of cell activation. *Nature* 274: 62-63, 1978.
- 159.- Brown, T.J., Ercolani, L., Ginsberg, B.H.: Properties and regulation of the T lymphocyte insulin receptors. *J. Receptor Res.* 3: 481-494, 1983.
- 160.- Thomopoulos, P.: Les récepteurs insuliniques des cellules sanguines circulantes. *Diabete and Metabolisme (Paris)* 7: 207-226, 1981.
- 161.- De Meyts, P.: Insulin and growth hormone receptors in human cultured lymphocytes and peripheral blood monocytes. In *Methods in Receptor Research* (Ed. M. Becher) M. Dekker Publ. Inc. N.Y. pp 1, 1976.
- 162.- Weinberg, A.N., Field, J.: Effect of insulin on the metabolism of white blood cells from normal and diabetic subjects. *Clin. Res.* 7: 247, 1959.
- 163.- Esmann, V.: Effect of insulin on human leukocytes. *Diabetes* 12: 545, 1963.

- 164.- Hadden, J.W., Hadden, E.M., Wilson, E.E., Good, R.A.:
Direct action of insulin on plasma membrane ATPase activity
in human lymphocytes. *Nature New Biology* 235: 174-176, 1972.
- 165.- Stossel, T.P., Mason, R.J., Hartwig, J., Vaughan, M.:
Quantitative studies of phagocytosis by polymorphonuclear
leukocytes: use of emulsions to measure the initial rate
of phagocytosis. *J. Clin. Invest.* 51: 615-624, 1972.
- 166.- Beck-Nielsen, H., Pedersen, O.: Insulin binding, insulin
degradation and glucose metabolism in human monocytes.
Diabetologia 17: 77-84, 1979.
- 167.- Helderman, J.H.: Role of insulin in the intermediary metab-
olism of the activated thymic-derived lymphocytes. *J.*
Clin. Invest. 67: 1636-1642, 1981.
- 168.- Strom, T.B., Bangs, J.D.: Human serum-free mixed lymphocyte
response: the stereospecific effect of insulin and its
potentiation by transferrin. *J. Immunol.* 128: 1555-1559,
1982.
- 169.- Maor, D., Englander, T., Eylan, E., Alexander, P.: Partic-
ipation of hormone in the early stages of the immune re-
sponse. *Acta Endocrinologica* 75: 205-208, 1974.
- 170.- Snow, E.Ch., Feldbush, T.L., Oaks, J.A.: The role of insu-
lin in the response of murine T lymphocytes to mitogenic
stimulation "in vitro". *J. Immunol.* 124: 739-744, 1980.
- 171.- Goldfine, I.D., Gardner, J.D., Neville, D.M.Jr., : Insulin
action in isolated rat thymocytes. I. Binding of ¹²⁵I-insulin
and stimulation of α -aminoisobutyric acid transport. *J.*
Biol. Chem. 247: 6919-6926, 1972.

- 172.- Boyett, J.D., Hoffert, J.F.: Stimulatory effect of insulin on glucose metabolism on thymus lymphocytes. *Horm. Metab. Res.* 4: 163-167, 1972.
- 173.- Sildan, N., Madar, J., Porá, E.A.: Insulin effect upon the "in vitro" glucose uptake by the white rat thymus during the age-and hydrocortisone-induced thymus involution. *Ann. d'Endocrinologie (París)* 36: 251-257, 1975.
- 174.- Frank, J.A., Kumagai, L.F., Dougherty, T.F.: Studies on the rates of involution and reconstitution of lymphatic tissue. *Endocrinology* 52: 656-668, 1953.
- 175.- Roldán, A., Stevens, J., Hollander, V.P.: Difference in the number of insulin binding sites between cortisol-sensitive and cortisol-resistant lymphoma P 1798. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151: 711-715, 1976.
- 176.- Roldán, A., Stevens, J., Hollander, V.P.: Effect of diabetes on growth of mouse lymphoma P 1798. *Acta Physiol. Latinoam.* 26: 221-223, 1976.
- 177.- Hoffert, J.F., Phillips, K.J.: "In vitro" insulin-stimulated conversion of U-¹⁴C glucose to ¹⁴CO₂ by rat thymocytes. *Endocrinology* 102: 751-756, 1978.
- 178.- Rerup, C.C.: Drugs producing Diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.* 22: 485-518, 1970.
- 179.- Mansford, K.R.L., Opie, L.: Comparison of metabolic abnormalities in Diabetes Mellitus induced by streptozotocin or by alloxan. *Lancet* 1: 670-671, 1968.

- 180.- Herr, R.R., Eble, T.E., Bergy, M.E., Jahnke, H.K.:
Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiot. Ann.* 236, 1959.
- 181.- Herr, R.R., Jahnke, H.K., Argoudelis, A.D.: The structure of streptozotocin. *J. Am. Chem. Soc.* 89: 4808-4809, 1967.
- 182.- Evans, J.S., Gerritsen, G.C., Mann, K.M., Owen, S.P.: Antitumor and hyperglycemic activity of streptozotocin (NSC 37917) and its cofactor (U-15774). *Cancer Chemoter. Rep.* 48: 1-6, 1965.
- 183.- Arison, R.N., Feudale, E.L.: Induction of renal tumor by streptozotocin in rats. *Nature (London)* 214: 1254-1255, 1967.
- 184.- Rakieten, N., Rakieten, M.L., Nadkarni, M.V.: Studies of the diabetogenic actions of streptozotocin (NSC 37917). *Cancer Chemoter. Rep.* 29: 91-98, 1963.
- 185.- Karunanayake, E.H., Baker, J.R.J., Christian, R.A., Hearse, D.J., Mellows, G.: Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of ^{14}C -streptozotocin in the rat. *Diabetología* 12: 123-128, 1976.
- 186.- Junod, A., Lambert, A.E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A.E., Renold, A.E.: Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126: 201-205, 1967.
- 187.- Schein, P.S., Bates, R.W.: Plasma glucose levels in normal and adrenalectomized mice treated with streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 17: 760-765, 1968.

- 188.- Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., Renold, A.E.: Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. J. Clin. Invest. 48: 2129-2139, 1969.
- 189.- Rhees, R.W., Wilson, C.T., Heninger, R.W.: Influence of streptozotocin Diabetes and insulin therapy on plasma corticosterone levels in male rats. Horm. Metab. Res. 15: 353-354, 1983.
- 190.- Murphy, E.D., Anderson, J.W.: Tissue glycolytic and gluconeogenic enzyme activities in mildly and moderately diabetic rats: Influence of tolbutamide administration. Endocrinology 94: 27-34, 1974.
- 191.- Banerjee, S.: Effect of certain substances on the prevention of diabetogenic action of alloxan. Science 106, 128-130, 1947.
- 192.- Schein, P.S., Cooney, D.A., Vernon, M.L.: The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. Cancer Res. 27: 2324-2332, 1967.
- 193.- Lazarow, A., Liambies, J., Tausch, A.J.: Protection against diabetes with nicotinamide. J. Lab. Clin. Med. 36: 249-258, 1950.
- 194.- Schein, P.S., Cooney, D.A., Mc Menamin, M.G., Anderson, T.: Streptozotocin Diabetes- further studies on the mechanism of depression of nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mouse pancreatic islets and liver. Biochem. Pharmacol. 22: 2625-2631, 1973.

- 195.- Long, C.N.H., Katzin, B., Fry, E.G.: The adrenal cortex and carbohydrate metabolism. *Endocrinology* 26: 309-344, 1940.
- 196.- Phillips, H.J.: Dye exclusion tests for cell viability. In *Tissue Culture Methods and Applications* (Ed. P.F. Kruse and M.K. Patteison Jr.) Academic Press New York pp 406-408, 1973.
- 197.- Beller, D.I., Unanue, E.R.: Thymic maturation "in vitro" by secretory product from macrophages. *J. Immunol.* 118: 1780-1787, 1977.
- 198.- Konda, S., Stockert, E., Smith, R.T.: Immunologic properties of mouse thymus cells: Membrane antigens patterns. *Cell. Immunol.* 7: 275-289, 1973.
- 199.- Shortman, J.: The separation of different cell classes from lymphoid organs.II. The purification and analysis of lymphocyte populations by equilibrium density gradient centrifugation. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 46: 375-396, 1968.
- 200.- Nichols, W.K.: Streptozotocin-induced immunosuppression. In *Streptozotocin. Fundamentals and therapy* (Ed. M.K. Agarwal) Elsevier North-Holland. Biomedical Press Amsterdam pp 55-68, 1981.
- 201.- Roldán, A., Filgueira, M.C., Eugui, E.M.: Efecto de la diabetes y el ayuno en el timo de la rata adrenopriva. Jornadas de invierno de la Sociedad Argentina de Inmunología, 28 de julio de 1978. Luján. *Acta Physiol. Latinoam.* 28: 336, 1978.

- 202.- Tabat, T., Okuno, Y., Fujii, S., Kimura, S., Kinoshita, Y.:
Maturational impairment of thymic lymphocytes in strepto-
zotocin-induced diabetes in rats. *Cell. Immunol.* 89: 250-
258, 1984.
- 203.- Dougherty, T.F., Berliner, M.L., Schneebeli, G.L., Berliner,
D.L.: Hormonal control of lymphatic structure and function.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 113: 825-843, 1964.
- 204.- Karmali, R.A., Horrobin, D.F.: Abnormalities of thymus
growth in dystrophic mice. *Nature (London)* 263: 684-685,
1976.
- 205.- Homo, F., Picard, F., Durant, S., Gagne, D., Simon, J.,
Dardenne, M., Duval, D.: Glucocorticoid receptors and their
functions in lymphocytes. *J. Steroid Biochem.* 12: 433-443,
1980.
- 206.- Wira, C., Munck, A.: Glucocorticoid-receptor complexes in
rat thymus cells. "Cytoplasmic"-nuclear transformation.
J. Biol. Chem. 249: 5328-5336, 1974.
- 207.- Naray, A., Arányi, P., Quiroga, V.: Comparative study of
glucocorticoid sensitivity and receptors in lymphoid tissue.
J. Steroid Biochem. 13: 415-421, 1980.
- 208.- Papamichail, M., Tsokos, G., Tsawdaroglou, N., Sekeries, C.E.
Immunocytochemical demonstration of glucocorticoid receptors
in different cell types and their translocation from the
cytoplasm to the cell nucleus in the presence of dexametha-
sone. *Expl. Cell. Res.* 125: 490-493, 1980.

- 209.- Schmidt, T.J., Barnett, C.A., Litwack, G.: Activation of the glucocorticoid receptor complex. *J. Cell. Biochem.* 20: 15-23, 1982.
- 210.- Munck, A., Wira, C., Young, D.A., Mosher, K.M., Hallahan, C., Bell, P.A.: Glucocorticoid-receptor complexes and the earliest steps in the action of glucocorticoids on thymus cells. *J. Steroid Biochem.* 3: 567-578, 1972.
- 211.- Sando, J.J., Hammond, N.D., Stratford, C.A., Pratt, W.B.: Activation of thymocyte glucocorticoid receptors to the steroid binding form. The roles of reducing adents, ATP, and heat stable factors. *J. Biol. Chem.* 254: 4779-4789, 1979.
- 212.- Higgins, S.J., Rousseau, G.G., Baxter, J.D., Tomkins, G.M.: Nature of nuclear acceptor sites for glucocorticoid and estrogen-receptor complexes. *J. Biol. Chem.* 248: 5873-5879, 1973.
- 213.- Rousseau, G.G., Higgins, S.J., Baxter, J.D., Gelfand, D., Tomkins, G.M.: Binding of the glucocorticoid receptors to DNA. *J. Biol. Chem.* 250: 6015-6021, 1975.
- 214.- Simons, S.S., Martínez, H.M., Garcea, R.L., Baxter, J.D., Tomkins, J.M.: Interactions of glucocorticoid receptor-steroid complexes with acceptor sites. *J. Biol. Chem.* 251: 334-343, 1976.
- 215.- Yamamoto, K.H., Gehring, U., Stampfer, M.R., Sibley, C.H.: Genetic approaches to steroid hormone action. *Recent Prog. Horm. Res.* 32: 3-32, 1976.

- 216.- Mosher, K.M., Young, D.A., Munck, A.: Evidence for irreversible, actinomycin D-sensitive, and temperature-sensitive steps following binding of cortisol to glucocorticoid receptors and preceding effects on glucose metabolism in rat thymus cells. *J. Biol. Chem.* 246: 654-659, 1971.
- 217.- Hallahan, C., Young, D.A., Munck, A.: Time course of early events in the action of glucocorticoid on rat thymus cells "in vitro". Synthesis and turnover of a hypothetical cortisol-induced protein inhibitor of glucose metabolism and of a presumed ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 248: 2922-2927, 1973.
- 218.- Voris, B.P., Young, D.A.: Glucocorticoid-induced proteins in rat thymus cells. *J. Biol. Chem.* 256: 11319-11329, 1981.
- 219.- Nichols, N.R., Khalid, B.A.K., Fuller, P.J., Rayson, B.M., Funder, J.W.: A common 43 K protein induced by glucocorticoid in a variety of cells and tissues. *Molec. Cell. Endocr.* 37: 197-204, 1984.
- 220.- Schaumburg, B.P.: Studies of the glucocorticoid binding protein from thymocytes. I. Localization in the cell and some properties of the protein. *Biochim. Biophys. Acta* 214: 520-532, 1970.
- 221.- Munck, A., Crabtree, G.R., Smith, K.S.: Glucocorticoid receptors and actions in rat thymocytes and immunological stimulated human peripheral lymphocytes. In *Monographs on Endocrinology. Vol 12 Glucocorticoid hormone action* (Ed. J. D. Baxter and G.G. Rousseau) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, pp 341-355, 1979.

- 222.- Pfahl, M., Sandros, T., Bourgeois, S.: Interaction of glucocorticoid receptors from lymphoid cell lines with their nuclear acceptor sites. *Molec. Cell. Endocr.* 10: 175-191, 1978.
- 223.- Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660-672, 1949.
- 224.- Tornello, S., Fridman, O., Weisenberg, L., Coirini, H., De Nicola, A.F.: Differences in corticosterone binding by regions of the central nervous system in normal and diabetic rats. *J. Steroid Biochem.* 14: 77-81, 1981.
- 225.- Homo, F, Duval, D., Hatzfeld, J., Evrard, C.: Glucocorticoid sensitive and resistant cell population in the mouse thymus. *J. Steroid Biochem.* 13: 135-143, 1980.
- 226.- Kahn, C.R., Goldfine, I.D., Neville, D.M.Jr., De Meyts, P.: Alterations in insulin binding induced by changes "in vivo" in the levels of glucocorticoids and growth hormone. *Endocrinology* 103: 1054-1066, 1978.
- 227.- Haring, H., Calle, C., Bug, A., Renner, R., Hepp, K.D., Kemmler, W.: Insulin binding and insulin action in rat fat cells after adrenalectomy. *Diabetología* 19: 379-385, 1980.
- 228.- Noall, M.W., Riggs, T.R., Walker, L.M., Christensen, H.N.: Endocrine control of amino acid transfer. *Science* 126: 1002-1005, 1957.

- 229.- Gazzola, G.C., Franchi, R., Saibene, V., Ronchi, P., Guidotti, G.G.: Regulation of amino acid transport in chick embryo heart cells. I. Adaptive systems of mediation for neutral amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* 226: 407-421, 1972.
- 230.- Akedo, H., Christensen, H.N.: Nature of insulin action on amino acid uptake by the isolated diaphragm. *J. Biol. Chem.* 237: 118-122, 1962.
- 231.- Guidotti, G.G., Borghetti, A.F., Gaja, J., Lo Reti, L., Ragnotti, G., Foà, P.P.: Amino acid uptake in the developing chick embryo heart. The effect of insulin on α -aminoisobutyric acid accumulation. *Biochem J.* 107: 565-574, 1968.
- 232.- Friedberg, S.H., Oka, T., Topper, Y.J.: Development of insulin-sensitivity by mouse mammary gland "in vitro". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 67: 1493-1500, 1970.
- 233.- Samson, M., Fehlmann, M., Morin, O., Dolais-Kitabgi, J., Freychet, P.: Insulin and glucagon binding and stimulation of amino acid transport in isolated hepatocytes from streptozotocin diabetic rats. *Metabolism* 31: 766-772, 1982.
- 234.- Simon, J.: Effect of insulin on glucose oxidation and aminoisobutyric acid transport and binding of insulin in chicken thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 585: 563-574, 1979.
- 235.- Goldfine, I.D.: Binding of insulin to thymocytes from suckling and hypophysectomized rats: Evidence for two mechanism regulating insulin sensitivity. *Endocrinology* 97: 948-954, 1975.

- 236.- Roth, J.: Peptide hormone binding to receptors: A review of direct studies "in vitro". *Metabolism* 22: 1059-1073, 1973.
- 237.- Freychet, P.: Interactions of polypeptide hormones with cell membrane specific receptors: Studies with insulin and glucagon. *Diabetologia* 12: 83-100, 1976.
- 238.- Cuatrecasas, P.: Properties of the insulin receptor isolated from liver and fat cell membranes. *J. Biol. Chem.* 247: 1980-1991, 1972.
- 239.- Kasuga, M., Hedo, J.A., Yamada, K.M., Kahn, C.R.: The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210.000 possible pro-receptor. *J. Biol. Chem.* 257: 10392-10399, 1982.
- 240.- Gammeltoft, S.: Insulin receptor: Binding kinetics and structure-function relationships of insulin. *Physiol. Rev.* 64: 1321-1378, 1984.
- 241.- Hepp, K.D.: Studies on the mechanism of insulin action: Basic concepts and clinical implications. *Diabetologia* 13: 177-186, 1977.
- 242.- Krahl, M.E.: Insulin action at the molecular level. Facts and speculations. *Diabetes* 21: 695-702, 1972.
- 243.- Mc Donald, J.M., Bruns, D.E., Jarett, L.: Ability of insulin to increase calcium binding by adipocytes plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 73: 1542-1546, 1976.

- 244.- Illiano, G., Tell, G.P.E., Siegel, M.I., Cuatrecasas, P.: Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate and the action of insulin and acetylcholine. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70: 2443-2447, 1973.
- 245.- Hepp, K.D.: Inhibition of glucagon stimulated adenylylase by insulin. FEBS Lett. 12: 263-266, 1971.
- 246.- Jungas, R.L.: Role of cyclic 3',5'-AMP in the response of adipose tissue to insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 56: 757-763, 1966.
- 247.- Steiner, D.F.: Insulin today. Diabetes 26: 322-340, 1977.
- 248.- Fujino, M., Wakimasn, M., Taketoni, S., Iwastuka, H.: Insulin-like activities and insulin-potentiating actions of a modified insulin B₂₁₋₂₆ fragment; β -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH₂. Endocrinology 101: 360-364, 1977.
- 249.- Lee, N.D., Williams, R.H.: The intracellular localization of labelled thyrosine and labelled insulin in mammalian liver. Endocrinology 54: 5-19, 1954.
- 250.- Carpentier, J-L, Gorden, P., Amherdt, M., Van Obberghen, E., Kahn, C.R., Orci, L.: ¹²⁵I-insulin binding to cultured human lymphocytes: Initial localization and fate of hormone determined by quantitative electron microscopic autoradiography. J. Clin. Invest. 61: 1057-1070, 1978.
- 251.- Goldfine, I.D., Smith, G.J., Wong, K.Y., Jones, A.L.: Cellular uptake and nuclear binding of insulin in human cultured lymphocytes. Evidence for potential intracellular sites of insulin action. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74: 1368-1372, 1977.

- 252.- Goldfine, I.D., Purrello, F., Clawson, G.A., Vigneri, R.: Insulin binding on the nuclear-envelope: potential relationships to mRNA metabolism. *J. Cell. Biochem.* 20: 29-39, 1982.
- 253.- Gorden, P., Carpentier, J-L, Fan, J-y, Orci, L.: Receptor mediated endocytosis of polypeptide hormones: Mechanism and significance. *Metabolism* 31: 664-669, 1982.
- 254.- Washka, M.E., Rice, E.W.: Determination of glucose by an improved "glucostat" procedure. *Clin. Chem.* 7: 542, 1961.
- 255.- Risser, W.L., Gelehrter, T.D.: Hormonal modulation of amino acid transport in rat hepatoma cells in tissue culture. *J. Biol. Chem.* 248: 1248-1254, 1973.
- 256.- Soll, A.H., Goldfine, I.D., Roth, J., Kahn, C.R.: Thymic lymphocytes in obese (ob/ob) mice. A mirror of the insulin receptor defect in liver and fat. *J. Biol. Chem.* 249: 4127-4131, 1974.
- 257.- Gozes, Y., Caruso, J., Strom, T.B.: The absence of cryptic insulin receptors on resting lymphocytes. *Diabetes* 30: 314-316, 1981.
- 258.- Bratush-Marrain, P.R.: Insulin-counteracting hormones: Their impact on glucose metabolism. *Diabetología* 24: 74-79, 1983.
- 259.- Kahn, C.R., Goldfine, I.D., Neville, D.M.Jr, De Meyts, P.: Alterations in insulin binding induced by changes "in vivo" in the levels of glucocorticoid and growth hormone. *Endocrinology* 103: 1054-1066, 1978.

- 260.- Olefsky, J.M., Johnson, J., Lin, F., Jin, P., Reaven, G.M.: The effects of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes. *Metabolism* 24: 517-527, 1975.
- 261.- Olefsky, J.M.: Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. *J. Clin. Invest.* 56: 1499-1508, 1975.
- 262.- Fantus, I.G., Ryan, J., Hizuka, N., Gorden, P.: The effect of glucocorticoid on the insulin receptor: an "in vivo" and "in vitro" study. *J. Clin. Endocr. Metab.* 52: 953-960, 1981.
- 263.- Beck-Nielsen, H., De Pirro, R., Pedersen, O.: Prednisone increases the number of insulin receptors on monocytes from normal subjects. *J. Clin. Endocr. Metab.* 50: 1-4, 1980.
- 264.- De Pirro, R., Bertoli, A., Fusco, A., Testa, I., Greco, A.V., Lauro, R.: Effect of dexamethasone and cortisone on insulin receptors in normal human male. *J. Clin. Endocr. Metab.* 51: 503-507, 1980.
- 265.- Kosmakos, F.C., Roth, J.: Insulin-induced loss of the insulin receptor in IM-9 lymphocytes. A biological process mediated through the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 255: 9860-9869, 1980.
- 266.- Ronnett, G.V., Tennekoon, G., Knutson, V.P., Lane, M.D.: Kinetics of insulin receptor transit to and removal from the plasma membrane. Effect of insulin-induced down-regulation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 258: 283-290, 1983.

- 267.- Harrison, L.C., Itin, A., Kasuga, M., Van Obberghen, M.: The insulin receptor on human lymphocyte: Insulin-induced down-regulation of 126.000 and 90.000 glycosylated subunits. *Diabetologia* 22: 233-238, 1982.
- 268.- Powers, A.C., Solomon, S.S., Duckworth, W.C.: Insulin degradation by mononuclear cells. *Diabetes* 29: 27-32, 1980.
- 269.- Duckworth, W.C., Kitabchi, A.E.: Insulin metabolism and degradation. *Endocr. Rev.* 2: 210-233, 1981.
- 270.- Yoksno, K., Roth, R.A., Bala, S.: Identification of insulin-degrading enzyme on the surface of cultured human lymphocytes, rat hepatoma cells, and primary cultures of rat hepatocytes. *Endocrinology* 111: 1102-1108, 1982.
- 271.- Rigas, D.A., Tisdale, V.V.: Bio-assay and dose response of the mitogenic activity to the phytohemagglutinin of "phaseolus". *Experientia* 25: 399-400, 1969.
- 272.- Pompidou, A., Rousset, S., Macé, B., Michel, P., Esnous, D., Renard, N.: Chromatin structure and nucleic acid synthesis in human lymphocytes activation by phytohemagglutinin. *Expt. Cell. Res.* 150: 213-225, 1984.
- 273.- Neveu, P.J., Perdoux, D., Reiss, D.: Regulation of lymphocyte transformation responses to phytohemagglutinin, Concanavalin A or lipopolysaccharide by normal serum. *Ann. Immunol (Inst. Pasteur)* 133: 69-82, 1982.

- 274.- Bernheim, J.L., Dorian, R., Mendelshon, J.: Pitfalls in the lymphocyte proliferation assay: variation in proliferation kinetics and cold thymidine pools. In Regulatory Mechanism in Lymphocytes Activation (Ed. D.O.Lukas) Acad. Press. N.Y. pp 464-466, 1977.
- 275.- Goodwin, J.S., Messner, R.P., Williams, R.C.Jr.: Inhibition of T-cell mitogenesis: Effect of mitogen dose. Cell. Immunol. 45: 303-308, 1979.
- 276.- Segel, G.B., Lukacher, A., Gordon, B.R., Lichtman, M.A.: Glucocorticoid suppression of human lymphocyte DNA synthesis: Influence of phytohemagglutinin concentrations. J. Lab. Clin. Med. 95: 624-632, 1980.
- 277.- Cook, J.D., Wayne Lai, D.V.M., Mc Grane, B.: The effect of suboptimal concentrations of mitogens on the immunosuppressive action of azathioprine and prednisolone on human lymphocytes "in vitro". J. Immunopharmacol. 5: 257-275, 1983.
- 278.- Castillo, M.B., González, M.D., Burton, G., Lantos, C.P., Roldán, A.: Dissociation of glucocorticoid effects of C-21 steroids at high concentrations in thymocytes. Experientia 39: 617-618, 1983.
- 279.- Bellinger, L.L., Mendel, V.E., Moberg, G.P.: Circadian insulin, GH, prolactin, corticosterone and glucose rhythms in fed and fasted rats. Horm. Metab. Res. 7: 132-135, 1975.

- 287.- Osborne, C.K., Monaco, M.E., Kahn, C.R., Huff, K., Bronzert, D., Lippman, M.E.: Direct inhibition of growth and antagonism of insulin action by glucocorticoids in human breast cancer cells in culture. *Cancer Res.* 39: 2422-2428, 1979.
- 288.- Strom, T.B., Bear, R.A., Carpenter, C.B.: Insulin-induced augmentation of lymphocyte mediated cytotoxicity. *Science* 187: 1206-1208, 1975.
- 289.- Maizel, A.L., Mehta, S.R., Hautf, S., Franzini, D., Lachman, L.B., Ford, R.J.: Human T lymphocyte/monocyte interactions in the response to lectins: Kinetics of entry into the S-phase. *J. Immunol.* 127: 1058-1064, 1981.
- 290.- Bruszewski, W.B., Bruszewski, J.A., Tonnu, H., Ferezy, S., O'Brien R.L., Parker, J.W.: Early mitogen-induced metabolic events essential to proliferation of human T lymphocytes: Dependence of specific events on the influence of adherent accessory cells. *J. Immunol.* 132: 2837-2843, 1984.
- 291.- Larsson, E.L., Iscove, N.N., Coutinho, A.: Two distinct factors are required for induction of T-cell growth. *Nature* 283: 664-666, 1980.
- 292.- Oppenheim, J.J., Stadler, B.M., Siraganian, R.P., Mage, M., Mathieson, B.: Lymphokines: Their role in lymphocyte response. Properties of interleukin-1. *Federation Proc.* 41: 257-262, 1982.
- 293.- Gery, I., Lepe-Zuniga, J.L.: Interleukin-1: Uniqueness of its production and spectrum of activities. *Lymphokines* 9: 109-125, 1984.

- 294.- Smith, K.A.: Interleukin-2. Ann. Rev. Immunol. 2: 319-333, 1984.
- 295.- Cantrell, D.A., Smith, K.A.: The interleukin-2 T-cell system. A new cell growth model. Science 224: 1312-1316, 1984.
- 296.- Ruscetti, F.W., Gallo, R.C.: Human T-lymphocyte growth factor: Regulation of growth and function of T lymphocytes. Blood 57: 379-394, 1981.
- 297.- Snyder, D.S., Unanue, E.R.: Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interleukin-1 production. J. Immunol. 129: 1803-1805, 1982.
- 298.- Stošić-Grujičić, S., Simic, M.M.: Modulation of interleukin 1 production by activated macrophages: "In vitro" action of hydrocortisone, colchicine and cytochalasin B. Cell. Immunol. 69: 235-247, 1982.
- 299.- Takemura, R., Werk, Z.: Secretory products of macrophages and their physiological functions. Am. J. Physiol. 246: C 1-9, 1984.
- 300.- Mishell, R.I., Bradley, L.M., Una Chen, Y., Grabstein, K., Shiigi, S.M.: Glucocorticosteroid response-modifying factors derived from accessory cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 332: 433-445, 1979.

