

Tesis de Posgrado

11beta-hidroxipregna-1,4-diene-3,20-dione, (delta HOP) proyección biológica, mecanismo de acción, diferencias y semejanzas con los glucocorticoides

Rondinone, Cristina Martha

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:

Rondinone, Cristina Martha. (1989). 11beta-hidroxipregna-1,4-diene-3,20-dione, (delta HOP) proyección biológica, mecanismo de acción, diferencias y semejanzas con los glucocorticoides. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2221_Rondinone.pdf

Cita tipo Chicago:

Rondinone, Cristina Martha. "11beta-hidroxipregna-1,4-diene-3,20-dione, (delta HOP) proyección biológica, mecanismo de acción, diferencias y semejanzas con los glucocorticoides". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2221_Rondinone.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Repatri N° 2021

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

11 β -HIDROXIPREGNA-1,4-DIENE-3,20-DIONE (Δ HOP)
PROYECCION BIOLÓGICA, MECANISMO DE ACCION
DIFERENCIAS Y SEMEJANZAS
CON LOS GLUCOCORTICOIDES

Autor : Cristina Martha Rondinone

Directora de Tesis : Dra Alicia Roldan

Tesis presentada para optar al título
de Doctor en Ciencias Biológicas

Instituto de Biología y Medicina Experimental

1989

- 2221 -

y. 2

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco especialmente a la Dra. Alicia Roldán, mi directora de tesis, por el aporte de sus conocimientos, apoyo y amistad demostrada en estos años.

A la Lic. Roxana Schillaci por su colaboración en este trabajo y su verdadera amistad.

Al Dr. Carlos Lantos por su asesoramiento en este trabajo y sus enseñanzas.

A los Dres Gerardo Burton y Mario Gonzalez por haber sintetizado la ΔHOP necesaria para poder realizar este trabajo.

A los Dres María Inés Morano y Fernando Estivariz de la Facultad de Medicina de la Universidad de la Plata por su colaboración en el dosaje del ACTH plasmático.

Al Dr. Alejandro Paladini por su asesoramiento y colaboración en la medición de la polarización de fluorescencia en timocitos.

A la Dra. Belinda Masa del Hospital Pedro Elizalde por el aporte de la sangre utilizada para la realización de los trabajos con células mononucleares.

Al Dr. Osvaldo Fridman , mi consejero de tesis, por su asesoramiento .

A todo el personal del Instituto de Biología y Medicina Experimental por la colaboración y amistad brindada.

INDICE GENERAL

	pág.
INTRODUCCION	1
CAPITULO I	
PERDURABILIDAD DEL EFECTO "IN VIVO"	8
- Generalidades	9
- Material y Métodos	
- Drogas y soluciones	10
- Tratamientos	10
- Medición de la incorporación de uridina- ³ H	11
- Determinación de la corticosterona plasmática	12
- Análisis estadístico	13
- Resultados	
- Perdurabilidad en tratamiento agudo	14
- Perdurabilidad en tratamiento crónico	16
- Discusión	23
CAPITULO II	
EFECTO ANTIINFLAMATORIO	25
- Generalidades	26
- Material y Métodos	
- Drogas	27
- Determinación de la capacidad antiinflamatoria	27

- Recuento y fórmula leucocitaria	28
- Determinación del efecto antiinflamatorio local	29
- Resultados	30
- Discusión	35

CAPITULO III

EFFECTO "IN VITRO" SOBRE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE

HUMANA	37
---------------	----

- Generalidades	38
- Material y Métodos	
- Drogas y soluciones	40
- Extracción y purificación de las células mononucleares	40
- Activación de los linfocitos y determinación de su proliferación por la síntesis de ADN	41
- Lavado y reincubación de las células	41
- Determinación de la síntesis de ADN	42
- Valoración de Il-1 por bioensayo	42
- Resultados	
- Efecto de Δ HOP y cortisol sobre linfocitos estimulados	44
- Efecto de Δ HOP y dexametasona sobre la producción de Il-1	45
- Discusión	49

CAPITULO IV

ACCIONES COLATERALES	51
- Generalidades	52
- Material y Métodos	
- Drogas y soluciones	54
- Medición de la retención de Na ⁺ - K ⁺ en orina	54
- Determinación del efecto gluconeogénico en hígado	55
- Determinación del ACTH y corticosterona plasmática	56
- Determinación del peso de órganos	56
- Resultados	57
- Discusión	63

CAPITULO V

MECANISMO DE ACCION

1) Polarización de fluorescencia	66
- Generalidades	66
- Material y Métodos	68
- Resultados y Discusión	69
2) Capping en timocitos	74
- Generalidades	74

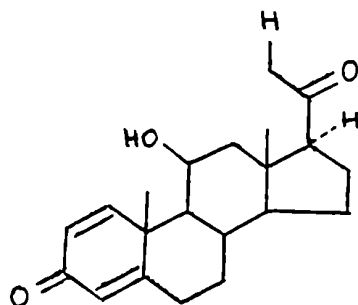
- Material y Métodos	
- Drogas y soluciones	76
- Técnica de capping	76
- Efecto "in vitro"	77
- Efecto "in vivo"	77
- Resultados y discusión	
- Efecto "in vitro"	79
- Efecto "in vivo"	87
3) Afinidad de 4HOP por los receptores de glucocorticoides	 93
- Generalidades	93
- Material y Métodos	
- Determinación de la unión de dexametasona- ³ H en timocitos enteros de ratas	94
- Resultados y Discusión	95
DISCUSION GENERAL	99
RESUMEN	103
BIBLIOGRAFIA	107

INTRODUCCION

En este laboratorio, estudiando el efecto de los pregnanoesteroides, se observó que uno de ellos, la 11 β -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (Δ HOP) fig.1, presentaba un comportamiento distinto al de los glucocorticoides clásicos en una de las acciones biológicas características de estos como es la inhibición en la incorporación de uridina-H³ en timocitos de ratas adrenaoprivas (1).

Fig. 1. Estructura química de la

11 β -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona.



Pocos grupos de investigación han realizado una correlación sistemática entre las características estructurales y biológicas de las moléculas glucocorticoides, a pesar de la importancia farmacológica. Entre ellos, Roldán et al.(1) y en la tesis del Dr. Mario González (2) se correlacionaron las propiedades inhibitorias de los esteroides sobre la incorporación de uridina en timocitos, con la estructura conformacional de los mismos por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de C¹³ (¹³C-n.m.r.). Ellos observaron

que la introducción de un enlace 1,2 a distintos esteroides, aumentaba la curvatura del esteroide y se mantenía la actividad glucocorticoide sólo en el caso de los compuestos 21-hidroxiados. Estos resultados modificaron la teoría de Weeks (3) y Raynaud (4) quienes por difracción de rayos X, asociaron el doble enlace 1,2 con una mayor flexión del anillo A hacia la cara del esteroide con un mayor efecto antiinflamatorio, independientemente del hidroxilo en C₁₁.

Trabajos recientes de Harmon et al.(5) y Duax et al.(6) sugieren que la molécula de 11 β -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona, contiene los mínimos requerimientos estructurales para la unión con el receptor glucocorticoide y la expresión hormonal; el anillo A estaría relacionado con la unión al receptor mientras que el hidroxilo en el C₁₁ estaría relacionado con la actividad biológica. De acuerdo a esto Δ HOP poseería la estructura básica que le proporcionaría actividad glucocorticoidea pero con una mayor curvatura de la molécula que el resto de los esteroides analizados, diferenciándose así de ellos.

Trabajos sobre el efecto catabólico y lítico de los glucocorticoides fueron realizados en la década del 60 por Munck et al.(7, 8, 9) y Makman et al.(10, 11). Ambos grupos utilizaron timocitos, estudiando el primer grupo, la inhibición producida por los glucocorticoides en la entrada de nutrientes y el segundo grupo, la biosíntesis de ácidos nucleicos. Estos efectos son explicados a través del mecanismo genómico de los glucocorticoides que consiste en los siguientes pasos: a) Entrada a la célula blanco por simple difusión y unión con gran afinidad a un receptor citoplasmático. b)

El complejo hormona-receptor se activa y es translocado al núcleo. c) En el núcleo, el complejo activado se une al sitio aceptor en la cromatina. d) La interacción del complejo hormona-receptor con el genoma origina la modulación de la síntesis de un ARN mensajero específico que codifica para una proteína inhibitoria. e) La síntesis de esta proteína es la responsable finalmente del efecto catabólico de los glucocorticoides (12, 13, 14). Esta respuesta es saturable por la limitada capacidad del receptor y desaparece el efecto en presencia de inhibidores de síntesis de ARN y de proteínas; existe un tiempo de latencia antes de la expresión de la respuesta y esta perdura una vez desencadenada, aún en ausencia del esteroide que lo produce (15, 16).

Delta HOP a bajas concentraciones ($10^{-7}M$ a $10^{-5}M$) se comporta como un glucocorticoide obteniéndose la clásica curva dosis-respuesta en la inhibición de síntesis de ARN, presentando además el efecto de lisis celular debido a la mayor curvatura de la molécula y al hidroxilo en C_{11} . Por el contrario, a mayores concentraciones (10^{-5} - $10^{-4}M$) en lugar de la típica curva de saturación, .HOP aumenta bruscamente su efecto inhibitorio sobre la incorporación de uridina- H^3 resultando este no saturable y desapareciendo paralelamente su acción lítica. De esta manera se obtuvo una disociación de los efectos inhibitorio y lítico; fenómeno que no se produjo con otros glucocorticoides de acuerdo a numerosos trabajos realizados (17, 18, 19). Solamente Gelehrter (20) con el análogo de Δ HOP, que carece del doble enlace 1,2, observó una disociación de efectos similar utilizando altas concentraciones ($10^{-4}M$) en células HTC.

La no saturabilidad del efecto de Δ HOP a altas concentraciones en la incorporación de uridina y la falta de lisis celular cumple con las características que propone Duval et al.(21) para un mecanismo no genómico que consisten en: a) Efecto instantáneo o de latencia muy corta, b) Recuperación muy rápida luego de la eliminación del esteroide, c) Insensibilidad frente a inhibidores de síntesis de ARN y proteínas. Esto permitió suponer que Δ HOP a altas concentraciones "in vitro" ejercía un efecto inhibitorio sobre la entrada de uridina a la célula a través de un mecanismo "no genómico"(22). Este comportamiento a altas concentraciones tiene como antecedente el efecto de la testosterona, progesterona y algunos compuestos estrogénicos, que ejercen su acción sobre la incorporación de uridina en forma inmediata (21).

Por otro lado, Δ HOP también se asemeja a los esteroides anestésicos (23) por ser un esteroide poco polar (debido al menor grado de hidroxilación), con cierto grado de actividad glucocorticoide (debido al hidroxilo 11 β) y con una cierta curvatura debido a la presencia del doble enlace 1,2. Los anestésicos se utilizan a altas concentraciones (24, 25, 26) y producen una respuesta rápida; esto sugiere un efecto sobre la membrana celular (27); que no es consecuencia de un mecanismo genómico y que se asocia en general con interacciones a nivel de la membrana plasmática, lisosomal o mitocondria (21).

De acuerdo a estas teorías, Δ HOP a altas concentraciones $10^{-4}M$ produciría "in vitro" un efecto inhibitorio mediante un mecanismo no genómico a través de la membrana plasmática.

La posibilidad de que ΔHOP pudiera actuar a través de un mecanismo diferente a los glucocorticoides nos impulsaron a estudiar el efecto de ella "in vivo" en vista de su aplicación farmacológica.

Farmacológicamente los glucocorticoides han sido utilizados como antiinflamatorios e inmunosupresores siendo muy efectivos en el tratamiento de diversas enfermedades como lupus eritematoso, artritis reumatoidea, asma, estados de hipersensibilidad o alergia, enfermedades dermatológicas y oftalmológicas como también en la profilaxis y tratamiento de trasplante de órganos (28).

En los tratamientos terapéuticos, los glucocorticoides son administrados en cantidades similares a la producción glucocorticoides normal (25 mg cortisol/día) pero estos niveles pueden aumentar en casos de mayor stress, llegando a administrarse en dosis masivas tal que su concentración en sangre produzca la saturación del receptor.

Las secuelas indeseables de la administración de los glucocorticoides dependen de la dosis utilizada y la potencia terapéutica de la droga. Los síntomas de un tratamiento crónico son: tendencia a la hiperglucemia y balance negativo de nitrógeno, redistribución de tejido adiposo, desordenes psíquicos, aumento del apetito, osteoporosis, pérdida de masa muscular, hipertensión, atrofia de órganos blanco como bazo, timo y glándulas suprarrenales, retención de sodio, supresión del eje hipotálamo-hipofisiario, inhibición del crecimiento, entre otros (29).

Es por ello que actualmente se trata de hallar compuestos que posean propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias pero que carezcan de estas acciones tóxicas.

Considerando lo dicho en esta introducción, se decidió investigar el efecto de Δ HOP "in vivo" comparándolo con los glucocorticoides tanto en su acción inmunosupresora y antiinflamatoria como tóxica.

CAPITULO I

PERDURABILIDAD DEL EFECTO "IN VIVO"

GENERALIDADES

Trabajos preliminares "in vivo" mostraron que 2 mg Δ HOP/100 g peso corporal (p.c.) inyectados a ratones, produjeron una inhibición en la incorporación de uridina "in vitro" en los timocitos, mayor que el producido por la misma dosis de corticosterona (22).

En este capítulo se estudia la aparición y perdurabilidad de este efecto, importante tanto desde el punto de vista básico como farmacológico, realizando una comparación entre Δ HOP y otros glucocorticoides en tratamientos agudos y crónicos.

Paralelamente se correlaciona este efecto semi-"in vivo" con las concentraciones de corticosterona plasmática.

MATERIAL Y METODOS

Drogas y soluciones

La Δ HOP fue sintetizada por los Doctores Gerardo Burton y Mario González del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, mientras que la dexametasona (Dex) fue donación de Merck Sharp & Dohme y la corticosterona (B) fue adquirida en Sigma Chemical Co.

La uridina-(5³H) y el protocolo fueron de New England Nuclear y el medio de cultivo RPMI 1640 de GIBCO (Grand Island N.Y.).

Tratamientos

Se trabajó con ratones Balb/c de 20 g de peso.

Los esteroides (Δ HOP, dexametasona y corticosterona) fueron disueltos en un solvente compuesto por 10% de etanol, 30% de propilenglicol y 60% de solución salina. Se inyectaron 20 μ l de esta solución con las dosis apropiadas de los esteroides.

En los tratamientos agudos se administró una inyección intraperitoneal (IP) y los animales fueron decapitados a las 5, 12, 18, 24 y 36 horas después de la inyección. En cambio, en los tratamientos crónicos se aplicaron 7 inyecciones cada 12 horas, 6 subcutáneas (SC) y la última IP. En este último caso los animales fueron sacrificados a las 5, 12, 18, 24, 36 y 48 horas después de la última inyección. Inmediatamente se extrajeron los plasmas de los distintos animales para dosar la corticosterona y los timos para realizar el

ensayo de incorporación de uridina con los timocitos. Los ratones tratados fueron comparados a cada una de las horas estudiadas con los controles inyectados con vehículo.

Medición de la incorporación de uridina-³H (Ur-³H)

Una vez extraídos los timos, se limpiaron y se aislaron los timocitos en RPMI 1640 cortando los mismos con tijera en trozos muy pequeños. La suspensión obtenida se filtró a través de un filtro de nylon de 200 mesh y las células se contaron en un hemocitómetro de Neubauer contra azul trypan para observar la viabilidad (30).

Suspensiones de timocitos ($1,3 \times 10^7$ cel/ml) se incubaron en tubos siliconados con RPMI 1640 durante 30 minutos a 37°C y en una atmósfera de 95% O₂ y 5% CO₂, en presencia de 0,5 uCi/ml de Ur-³H (actividad específica 25 Ci/mmol).

Finalizada la incubación todas las operaciones se realizaron a una temperatura entre 0°C y 4°C. Las células se trasvasaron a tubos cónicos, se centrifugaron 5 minutos a 100g y se lavaron 2 veces con 1 ml de buffer Hank's para eliminar la radioactividad no incorporada a la célula. Finalmente se contaron en un hemocitómetro, siendo la viabilidad mayor del 90% (por exclusión del azul trypan). Posteriormente se rompieron con 5% de ácido perclórico (PCA) y las fracciones solubles e insolubles fueron separadas por centrifugación. La fracción ácido insoluble se disolvió en protosol y se transfirió a viales con tolueno centellante, mientras que 0,3% de la fracción soluble se contó en 30% de triton-tolueno. La radioactividad se leyó en un contador de centelleo líquido.

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

Como el porcentaje de $Ur-^3H$ incorporada en las fracciones solubles e insolubles dieron valores semejantes, en este capítulo se muestran solamente los valores de la fracción insoluble.

Determinación de la corticosterona plasmática

Por temor a la interferencia de ΔHOP en el dosaje de corticosterona plasmática, esta se dosó por las técnicas de radioinmunoensayo (RIA)(31), radiocompetición proteica (32) y fluorométrica. De acuerdo a los resultados que se presentan más adelante se observó que esta última era la más adecuada, ella se basa en el método de Silber (33) con algunas modificaciones. Esta técnica se realizó de la siguiente manera: se tomaron 100 μ l de plasma y se les agregó 400 μ l de solución salina y 2 ml de cloruro de metileno, y se agitó en Vortex durante 15 segundos. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 2000 rpm y así quedaron definidas dos fases. Se aspiró la fase acuosa, y la otra fase se mezcló con 1,5 ml de una solución de 70% de ácido sulfúrico y 30% de etanol en tubos con tapa. Esto se agitó lentamente durante 30 minutos y luego se lo dejó en reposo durante 90 minutos a $4^{\circ}C$. Finalmente se aspiró el cloruro de metileno (fase de arriba) y se leyó la fluorescencia del ácido sulfúrico en un fluorímetro utilizando una longitud de onda fluorescente de 520 nm y una longitud de onda activada de 470 nm.

Se realizaron soluciones patrones de corticosterona en concentraciones de 1 ng/ml a 250 ng/ml y se realizó la curva absorbancia-ug/100ml de plasma.

Cabe destacar que cuando a plasmas de ratones adrenoprivos se les agregó Δ HOP no se detectó corticosterona por la técnica fluorimétrica, lo que indica que tanto "in vitro" como "in vivo" Δ HOP no interfiere en el dosaje de corticosterona.

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias estadísticamente significativas se utilizó el test de Duncan's considerándose $p < 0,05$.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra los valores de distintos esteroides utilizando diferentes técnicas de dosaje de corticosterona en plasma de ratón con tratamiento agudo de Δ HOP. En ella se observa que solamente Δ HOP interfiere con los valores de corticosterona por RIA y tiene igual afinidad que el cortisol por la proteína transportadora de acuerdo a la técnica de radiocompetición proteica, siendo ambos mayores que la corticosterona.

Estos resultados indicaron que la única técnica adecuada para dosar corticosterona en animales tratados con Δ HOP era la fluorométrica.

Perdurabilidad en tratamiento agudo

En estos experimentos se utilizaron dosis de 2 mg/100 g p.c. de corticosterona y Δ HOP, además de un potente glucocorticoide sintético, dexametasona, como control de efecto inhibitorio. Estudios con este último esteroide mostraron que la mínima dosis para producir el máximo efecto era 0.033 mg/100 g p.c. por lo que se la eligió para los tratamientos.

Tabla 1. Comparación de especificidad por diferentes esteroides

(previa extracción con diclorometano).

	METODOS		
	Fluorométrico	RIA	Radiocom.Prot
Corticosterona	100,00 %	100,00 %	100,00 %
Cortisol	54,00 %	8,60 %	235,00 %
11-Desoxicorticosterona	5,00 %	3,00 %	60,00 %
Progesterona	1,00 %	0,80 %	9,60 %
Androstenodiona	2,00 %	1,00 %	2,30 %
Aldosterona	1,00 %	1,00 %	3,80 %
Dexametasona	< 1,00 %	4,00 %	< 0,16 %
11 β OH-progesterona		0,60 %	100,00 %
Cortisona	-----	0,03 %	1,90 %
Δ HOP	< 1,00 %	60,00 %	> 270,00 %

La figura 2 muestra que 0.033 mg de Dex/100 g p.c. produjo la máxima inhibición a las 5 horas de la inyección, posteriormente este efecto disminuyó desapareciendo después de las 18 horas; 2 mg/100 g p.c. de corticosterona presentó un efecto similar, pero la inhibición máxima se mantuvo hasta las 12 horas. Por el contrario, 2 mg/100 g p.c. de ΔHOP produjo el máximo de inhibición a las 18 horas, disminuyendo de la misma forma que dexametasona y desapareciendo recién a las 36 horas. Cabe destacar que el efecto máximo alcanzado por ΔHOP fue significativamente mayor al obtenido por dexametasona. (La uridina-³H incorporada por los timocitos de los animales controles fue de 31.159 ± 1.926 cpm/ 10^7 células a todos los tiempos estudiados).

La tabla 2 muestra que los niveles de corticosterona de los animales tratados con ΔHOP fueron iguales a los valores controles a todas las horas estudiadas, en cambio dexametasona produjo una disminución significativa de estos valores 5 horas después de la inyección, normalizándose a las 12 horas.

Perdurabilidad en tratamiento crónico

Considerando que trabajos preliminares demostraron que una inyección subcutánea cada 12 horas produce una acumulación de los esteroides en sangre, las dosis utilizadas en tratamientos crónicos fueron más bajas que las utilizadas en los agudos.

La tabla 3 muestra que 5 horas después de la última inyección, tratamientos crónicos de 100, 200 o 300 ug de ΔHOP por cada 100 g p.c. no produjo inhibición en la incorporación de uridina "in

vitro" por los timocitos, pero 400 ug del esteroide provocó un 40% de inhibición. De acuerdo a esto, se eligió una dosis de 500 ug/100 g p.c. de Δ HOP (un cuarto de la dosis del tratamiento agudo), manteniendo para los otros esteroides la misma proporción.

La figura 3 muestra que 7 dosis de 500 ug de corticosterona cada 100 g p.c. no produjeron efecto inhibitorio, sino que por el contrario a las 12, 18 y 24 horas apareció una estimulación del 20% en la incorporación del nucleótido. Por otro lado, Δ HOP produjo una inhibición máxima 5 horas después de la inyección, que se mantuvo hasta las 36 horas, desapareciendo a las 48 horas. Dexametasona 0.008 mg/100 g p.c., produjo la misma inhibición que Δ HOP a las 5 horas de la inyección, pero el efecto desapareció rápidamente después de las 12 horas.

La corticosterona plasmática fue medida en los animales tratados con dexametasona y Δ HOP a las 5, 18 y 24 horas después del tratamiento. La tabla 4 muestra que en tratamientos crónicos Δ HOP tampoco alteró las concentraciones de corticosterona plasmática, mientras que dexametasona mantuvo estos niveles por debajo de los niveles normales hasta las 18 horas, recobrándose a las 24 horas.

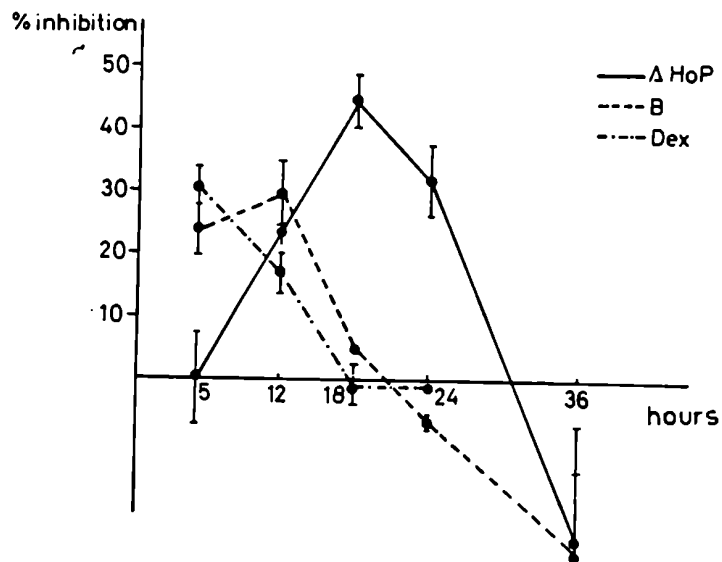


Fig.2. Inhibición de la incorporación de uridina- H^3 al ARN de timocitos de ratones inyectados con dexametasona (---) 0,033 mg/ 100 g p.c. o con 2 mg/ 100 g p.c. de Δ HOP (—) o de corticosterona (-.-.-) y sacrificados a distintos tiempos.

Tabla 2. Efecto de Δ HOP y dexametasona (Dex) sobre los niveles de corticosterona plasmática (ug/ 100 ml) a diferentes horas después de una sola inyección de los esteroides

Compuesto	Horas			
	5	12	18	24
Vehíc.	43,5 \pm 6,5 (9)	34,3 \pm 6,7 (6)	29,5 \pm 1,9 (6)	40,1 \pm 5,0 (9)
Δ HOP	37,5 \pm 5,8 (9)	40,9 \pm 9,8 (6)	29,2 \pm 9,2 (6)	51,8 \pm 6,4 (9)
Dex	16,6 \pm 2,7 (6)*	29,1 \pm 9,9 (6)	39,8 \pm 6,7 (6)	48,7 \pm 10,7 (3)

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard.

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

* p < 0.01 según el test de Duncan's con respecto a los animales tratados con vehículo.

Tabla 3. Dosis mínimas en tratamientos crónicos. Determinación del efecto inhibitorio de Δ HOP sobre la incorporación de uridina- 3 H en timocitos de ratas tratadas con distintas dosis del esteroide.

ug Δ HOP/100 g de p.c.	% Inhibición precipitado PCA
500	72 \pm 2
400	40 \pm 10
300	5 \pm 3
200	-9 \pm 0
100	-34 \pm 1

Cada valor es el promedio \pm error standard de un grupo de 6 animales.

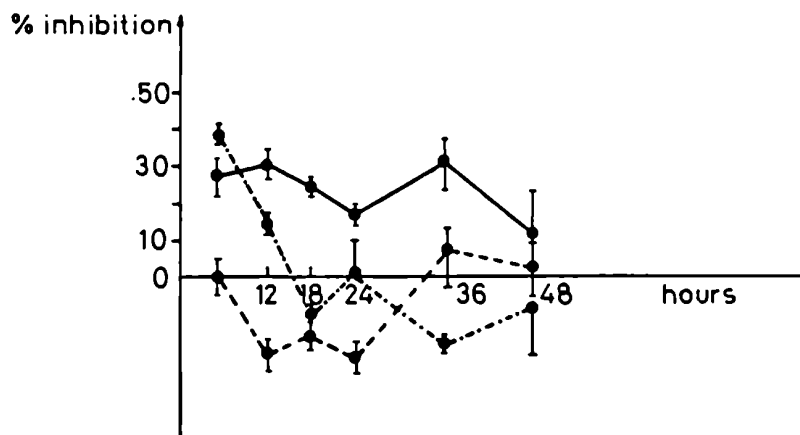


Fig.3. Inhibición de la incorporación de uridina- H^3 al ARN de timocitos de ratones inyectados en forma crónica con Δ HOP (—) o dexametasona (- - - -) o corticosterona (-) y sacrificados a distintos tiempos.

Tabla 4. Efecto de ΔHOP y dexametasona (Dex) sobre los niveles de corticosterona plasmática (ug/ 100 ml) a diferentes horas de la última inyección en tratamiento crónico

Compuesto	Horas		
	5	18	24
Vehículo	64,6 ± 8,5 (16)	52,5 ± 7,3 (12)	73,0 ± 6,0 (6)
ΔHOP	83,0 ± 12,0 (10)	70,5 ± 9,8 (10)	-----
Dex	29,2 ± 8,1 (7)*	25,5 ± 3,1 (10)*	80,0 ± 11,0 (6)

Los resultados se expresan como promedio ± error standard.

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

* p < 0,01 según el test de Duncan's.

DISCUSION

El efecto de los glucocorticoides ha sido ampliamente estudiado tanto "in vitro" como "in vivo", pero la relación que existe entre dosis y efecto no está completamente aclarada. De acuerdo a los trabajos de Hall et al. (34) la dosis necesaria de glucocorticoide para obtener un efecto protector en el sistema nervioso central es muy superior a la requerida para saturar los receptores tanto "in vivo" como "in vitro".

En este capítulo se observa que tanto en tratamientos agudos como crónicos, altas concentraciones de 4HOP producen un efecto inhibitorio en la incorporación de uridina por los timocitos, mayor que el de los otros esteroides utilizados, demostrando que si bien el efecto observado no es fisiológico, debido a la alta dosis necesaria para producirlo, tampoco es un mero artefacto de las experiencias "in vitro".

Considerando que los glucocorticoides estudiados presentan el máximo efecto terapéutico y/o inhibitorio 4 a 6 horas después de una única inyección, desapareciendo el mismo a las 24 horas (35, 36, 37); los resultados obtenidos con corticosterona y dexametasona concuerdan con este mecanismo. Por el contrario 4HOP difiere del patrón general glucocorticoide en el período entre inyección y efecto, por alcanzar la máxima inhibición, 18 horas después de la inyección. Además este esteroide no alteró los niveles de corticosterona plasmática, como lo hacen los glucocorticoides (38, 39, 40) no sucediendo lo mismo con dexametasona que produjo una disminución a las 5 horas después de la inyección.

Los experimentos crónicos confirmaron estos resultados. Delta HOP produjo una inhibición del 30% en la incorporación de uridina después de 5 horas de la última inyección, manteniendo este efecto hasta las 36 horas sin producir cambios en los niveles de corticosterona plasmática. La fuerte inhibición producida por dexametasona en la incorporación de uridina y en los niveles de corticosterona concuerda con trabajos realizados con glucocorticoides clásicos, en los que el efecto comienza a las 5 horas y desaparece después de las 18 horas (35).

El hecho que corticosterona tenga efecto inhibitorio en el tratamiento agudo y no en el crónico podría atribuirse a la estructura de la molécula. Es factible que Δ HOP por su poca polaridad, doble enlace y gran afinidad a la proteína transportadora sea más difícil de eliminar que la corticosterona lo que provocaría en tratamientos crónicos que Δ HOP se acumule más fácilmente que esta, conservándose de esa forma la cantidad necesaria para que el esteroide tenga efecto. Esta teoría estaría en concordancia con el hecho que la corticosterona tiene un efecto opuesto sobre el timo, acción clásica de las hormonas a bajas concentraciones.

Los resultados obtenidos con los tratamientos tanto agudos como crónicos indicarían que Δ HOP "in vivo" inhibiría la incorporación de uridina por los timocitos sin producir la característica inhibición de la corticosterona circulante. Estos resultados sugieren que Δ HOP a pesar de tener una estructura molecular similar a los glucocorticoides, su efecto y mecanismo de acción serían distintos al de estas hormonas.

CAPITULO II

EFEECTO ANTIINFLAMATORIO

GENERALIDADES

En el capítulo anterior, se estudió la inhibición producida por Δ HOP en la incorporación de uridina en timocitos de animales tratados, midiendo la perdurabilidad del efecto. Pero una prueba más directa para verificar la posible utilización farmacológica del esteroide es la medición de su capacidad antiinflamatoria.

Es sabido que la respuesta inflamatoria se produce cuando el organismo sufre una injuria determinada. Este proceso es por lo tanto defensivo (41) e involucra a distintos tipos de células, factores mediadores y enzimas (42). Los glucocorticoides actúan a distintos niveles inhibiendo la inflamación: regulando el tráfico celular del organismo (43), actuando sobre las funciones de las células intervinientes e inhibiendo la biosíntesis de mediadores pre-inflamatorios (44).

El primer paso de una respuesta inflamatoria, es la migración de los leucocitos al área de inflamación (45). La administración de glucocorticoides produce una marcada linfocitopenia, monocitopenia y eosinopenia (37, 46), disminuyendo la acumulación de estas células en el área de inflamación. Este mecanismo se debe a una redistribución de las células fuera de la circulación, con una acumulación en órganos linfáticos como la médula ósea, timo, bazo y nódulos (47).

Es por eso, que en este capítulo se determinó la acción antiinflamatoria de Δ HOP por vía inyectable, oral o tópica en ratas a las cuales se les indujo edema. Además, para averiguar si Δ HOP tenía este efecto regulando el tráfico celular, como lo hacen los glucocorticoides, se midió la leucopenia de los animales tratados.

MATERIAL Y METODOS

Drogas

La carragenina tipo IV utilizada para inducir edemas (48) y el aceite de crotón, así como la progesterona fueron de Sigma Chemical Co.

Animales de experimentación - Tratamientos por vía inyectable u oral

Se utilizaron ratas Sprague Dawley de dos meses con las cuales se realizaron tratamientos crónicos y agudos administrando los esteroides en forma inyectable según se describe en el capítulo 1.

Por otro lado para investigar la actividad de Δ HOP por vía oral, se administró por sonda el esteroide disuelto en un vehículo compuesto por 10% de etanol, 20% de propilenglicol y 70% de solución fisiológica. También en este caso se efectuaron tratamientos agudos y crónicos.

Determinación de la capacidad antiinflamatoria

En todos los tratamientos, a las 3 horas de la última inyección se inyectó la planta de la pata derecha de cada una de las ratas con 0,1 ml de carragenina diluída al 2% en solución fisiológica, y la planta de la pata izquierda, con 0,1 ml de solución fisiológica

(49). Además se les extrajo sangre de la cola para realizar recuento y fórmula leucocitaria. A las 2 horas, se procedió a sacrificar los animales, cortar las patas, pesarlas y observar la diferencia de peso entre ambas patas de un mismo animal. La actividad antiinflamatoria es medida por la disminución del peso de la pata en la que se indujo edema.

Recuento y fórmula leucocitaria

Se colocaron 0,02 ml de sangre extraída de cada rata en un frasco conteniendo 0,38 ml de ácido acético al 2%. Se cargó la cámara de Neubauer y se contaron los 4 cuadrantes externos. El valor obtenido se reemplazó en la siguiente fórmula:

$$\text{Leucocitos por mm}^3 = \frac{n \times 20 \times 10}{4}$$

siendo n = número de células en los 4 cuadrantes

20 = dilución de la sangre

10 = altura de la cámara.

Para observar la fórmula leucocitaria, se realizaron extendidos de sangre que fueron coloreados con May-Grunwald-Giemsa.

Determinación del efecto antiinflamatorio local

Para esta determinación se utilizó la técnica descrita por Tonelli et al. (50) que consiste en la preparación de un vehículo compuesto por 4 partes de piridina, 1 parte de agua destilada, 5 partes dietil eter y 10 partes de 2% de aceite de crotón en dietil éter (v/v), este vehículo se aplica a la oreja derecha de la rata, a las 4 horas los animales se anestesian con éter, se extraen ambas orejas y se pesan. El índice de inflamación (Ii) se calcula:

$$I_i = \frac{P_t - P_c}{P_c} \times 100$$

donde P_t es el peso de la oreja tratada con aceite de crotón y P_c el peso de la oreja sin tratar.

Para probar el efecto antiinflamatorio tópico de los esteroides, estos se disuelven a las concentraciones elegidas en el mismo vehículo y se aplica en la oreja derecha. El efecto antiinflamatorio se determina comparando los índices de inflamación de las orejas tratadas solamente con aceite de crotón en comparación a las que tuvieron esteroides.

RESULTADOS

Los resultados de la actividad antiinflamatoria por tratamiento oral agudo y crónico de Δ HOP se muestran en la tabla 5, este esteroide produjo una alta inhibición de la inflamación en ambos casos.

Cuando el tratamiento se realizó en forma inyectable Δ HOP tanto en forma aguda como crónica inhibió igual que la dexametasona la acción inflamatoria de la carragenina, no teniendo efecto ni la corticosterona ni la progesterona según se observa en la tabla 6. En estos animales, según la tabla 7 dexametasona provocó una leucopenia marcada, no así Δ HOP.

Las fórmulas leucocitarias (tabla 8) realizadas luego del tratamiento crónico inyectable muestran que Δ HOP y dexametasona producen proporcionalmente una disminución de los linfocitos y de los eosinófilos, aumentando en consecuencia los neutrófilos. Estos efectos son más marcados con dexametasona.

Finalmente la tabla 9 muestra los resultados obtenidos luego de aplicar Δ HOP o dexametasona en forma tópica junto con el aceite de crotón. Se observa que ambos esteroides disminuyeron la inflamación en un 50% y en un 70% respectivamente.

Tabla 5. Efecto antiinflamatorio de Δ HOP. Tratamiento por vía oral

Tratamiento agudo			Tratamiento crónico			
Compuesto	n	Δ de peso	% Inhib.	n	Δ de peso	% Inhib.
Vehículo	5	384 \pm 38		5	532 \pm 126	
Δ HOP	5	222 \pm 39	42	6	336 \pm 40	37

n = número de animales en cada grupo.

Δ de peso = diferencia de peso entre la pata inyectada con caragenina y la pata control de un mismo animal en mg.

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

Tabla 6. Acción antiinflamatoria de esteroides. Dosis inyectables.**a) Tratamiento agudo**

Compuesto	n	Diferencia de peso (mg) entre las patas	% Inhibición Inflamación
Vehículo	10	398 ± 38	-----
Dex 0,033 mg	10	119 ± 10 *	69 ± 3
ΔHOP 2mg	6	138 ± 22 *	65 ± 5
Progesterona 2mg	6	366 ± 43	6 ± 10
Corticoster. 2mg	3	396 ± 15	-13 ± 4

Las dosis indicadas son cada 100 g de p.c.

b) Tratamiento crónico

Compuesto	n	Diferencia de peso (mg) entre las patas	% Inhibición Inflamación
Vehículo	8	386 ± 23	-----
Dex	8	106 ± 15 *	73 ± 6
ΔHOP	9	163 ± 12 *	59 ± 6

Las dosis utilizadas en tratamiento crónico se detallan en material y métodos.

* p < 0,001 segun test de Student's.

Tabla 7. Efecto de Δ HOP y dexametasona (Dex) en el número de leucocitos en sangre

Compuesto	Tratamiento Agudo		Tratamiento crónico	
	n	leucoc/mm ³	n	leucoc/mm ³
Vehículo	6	24.058 \pm 2395	12	25.541 \pm 3640
Δ HOP	6	22.383 \pm 2188	8	23.350 \pm 3509
Dex	6	9.633 \pm 1911*	8	11.606 \pm 1213*

Los resultados corresponden al promedio \pm el error standard.

* p < 0,001 segun test de Student's.

Tabla 8. Fórmula leucocitaria obtenida luego de un tratamiento crónico inyectable con los esteroides

Compuesto	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)
Vehículo (12)	60 \pm 3	3	32 \pm 3	2
Δ HOP (8)	44 \pm 9	3	52 \pm 8	1
Dex (8)	10 \pm 2	1	87 \pm 2	1

Los valores entre paréntesis indican el número de animales tratados.

Los resultados corresponden al promedio \pm el error standard.

Tabla 9. Efecto antiinflamatorio tópico

Compuesto	n	Indice inflamación	% Inhibición
Vehículo	12	106 ± 13	-----
ΔHOP (6mg/ml)	6	55 ± 6*	51
Dex (0,1mg/ml)	6	31 ± 12*	71

Los resultados corresponden al promedio ± el error standard de las n determinaciones.

Las concentraciones entre paréntesis indican los mg de esteroide disueltos por ml de solución de aceite de crotón.

* p < 0,001 segun test de Student's.

DISCUSION

La acción antiinflamatoria de Δ HOP observada en estos estudios fue semejante a la producida por un potente glucocorticoide como lo es la dexametasona y cuyos efectos antiinflamatorios ya han sido demostrados ampliamente (51, 52, 53).

El efecto antiinflamatorio por vía oral semejante al inyectable indicaría una gran estabilidad de la molecula que no sería destruída en el tracto digestivo. Esta estabiliidad coincide con la gran perdurabilidad del efecto biológico observado en el capítulo anterior y que se le adjudica a su estructura molecular.

Los resultados obtenidos en la aplicación tópica de Δ HOP coincide con trabajos en los que se demuestra que los compuestos 11β -hidroxilados son potentes antiinflamatorios tópicos (54), pero a diferencia de los glucocorticoides que también tienen esa característica, Δ HOP no alteró los pesos de timos y bazos despues de 48 horas de la aplicación según se observó en el laboratorio.

Los resultados obtenidos del recuento leucocitario demuestran que Δ HOP tendría muy poco efecto sobre la motilidad de estas células ya que el número de leucocitos totales no varió, pero disminuyó levemente el porcentaje de linfocitos y eosinófilos en el tratamiento crónico. Estos resultados contrastan con la marcada leucopenia, linfopenia y eosinopenia que producen los glucocorticoides (55, 56, 57).

Todos estos resultados muestran que Δ HOP actuaría como antiinflamatorio en forma distinta a los glucocorticoides, afectando por una parte solo levemente la circulación leucocitaria, pero debido a

que el proceso inflamatorio de por sí es sumamente complejo, además del importante papel que tiene sobre el mismo el sistema inmune, queda por investigar si Δ HOP afecta las funciones de este último y la de los factores que intervienen en ambos, especialmente la Il-1 segregada por los macrófagos.

CAPITULO III

EFEECTO "IN VITRO" SOBRE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE HUMANA

GENERALIDADES

En el capítulo anterior se demostró la capacidad antiinflamatoria de ΔHOP concordante con una leve disminución de los linfocitos circulantes pero sin alterar el número de leucocitos totales en sangre. Queda por aclarar si este esteroide actúa directamente sobre estas células y/o sobre los factores segregados por ellas.

Es sabido que entre los múltiples mecanismos por los que los glucocorticoides disminuyen la respuesta inmune se encuentra la inhibición de la proliferación linfocitaria (58, 59). Dos factores solubles están asociados con la proliferación y diferenciación de los linfocitos. Uno de ellos es la interleuquina-1 (Il-1)(60, 61), producida por los macrófagos activados por un antígeno o mitógeno, que actúa sobre las células T helper para liberar otro factor llamado interleuquina 2 (Il-2) (62, 63). Dichos factores, que son polipéptidos, actúan sobre las células T, que responden, proliferan y se diferencian en células T efectoras (64). Ambos están directamente relacionados ya que la secreción de Il-2 por los linfocitos es dependiente de la secreción de Il-1 por los macrófagos (65).

Los glucocorticoides inhiben esta proliferación por distintos caminos, por un lado, producen un efecto inhibitorio directo en el metabolismo (17) y en la estimulación de los linfocitos por inhibir la secreción de Il-1 por los macrófagos (66) y de Il-2 por los linfocitos (67).

En consideración a todo lo descrito, se investigó el efecto de ΔHOP comparado con el del cortisol (hormona glucocorticoidea natural del hombre) en la proliferación de linfocitos humanos

estimulados "in vitro" con phitohemoaglutinina (PHA)(mitógeno específico para la línea T) y también se decidió investigar la acción de 4HOP comparándola con la de dexametasona sobre la producción de Il-1 por los monocitos.

MATERIAL Y METODOS

Drogas y soluciones

Metil-timidina³H (AE 6,7 Ci/mmol) fue provista por New England Nuclear (Boston M.A.). Ficoll (PM = 400.000), Hepes (pka 7,5 a 25°C), phitohemoaglutinina P (PHA-P), Lipopolisacarido E.coli (LPS) y cortisol fueron de Sigma. El suero fetal bovino marca GIBCO fue de complementado (30 minutos a 56°C) antes de usar.

El Hypaque como sal sódica fue donado por Farmasa Farmacéutica Argentina.

Los esteroides utilizados se disolvieron en RPMI 1640 para dar una concentración de 10^{-4} M mediante sonicación y las diferentes diluciones se realizaron en medio de cultivo.

Extracción y purificación de las células mononucleares

Las células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) se obtuvieron por gradiente de ficoll-hypaque según Boyum (68) y los cultivos se realizaron de acuerdo a la técnica de la Dra. Marta Castillo (69).

La sangre venosa humana (40-60ml) se extrajo en forma estéril con heparina (10U/ ml de sangre), y se diluyó con igual volumen de solución fisiológica, 4 ml de dicha dilución se agregaron sobre 3 ml de Ficoll-Hypaque (densidad = 1,075-1,077) formándose dos fases. Se centrifugó 40 minutos a 500g y la interfase con las CMSP se trasvasó a tubos cónicos, lavándose tres veces con solución

fisiológica más penicilina 1%. Las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10mM de Hapes (pH 7,4-7,5), 2mM de L-glutamina, penicilina (100U/ ml), streptomicina (100ug/ ml) y 10% de suero fetal bovino y se contaron por exclusión de azul trypan para determinar la viabilidad.

Activación de los linfocitos y determinación de su proliferación por la síntesis de ADN

Los cultivos de CMSP se realizaron por cuadruplicado en tubos de vidrio estériles cerrados con tapones de goma, conteniendo cada uno 10^6 cel/ ml. No se utilizaron microplacas de 96 cápsulas debido a que se quiso investigar el mecanismo de acción de Δ HOP y para ello fue necesario realizar lavado de células.

Las células se cultivaron durante 48 horas a 37°C en presencia de PHA-P (5 ug/ ml) y de las correspondientes concentraciones de Δ HOP y cortisol.

Lavado y reincubación de las células

A las 18 horas de cultivar las células en presencia o ausencia de los esteroides, se trasvasaron a tubos cónicos y se lavaron con 5 ml de RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino. Luego se contaron y se cultivaron nuevamente con PHA en presencia o ausencia de los esteroides durante 48 horas de acuerdo al protocolo que se muestra en resultados.

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 durante las últimas 5 horas de cultivo.

A las 48 horas, los cultivos se centrifugaron a 1.500 g. y el pellet final se resuspendió en 1 ml de agua destilada con 0,25% de albúmina bovina 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 viales con 3 ml de tolueno centellante y se contaron en un contador de centelleo líquido.

Valoración de Il-1 por bioensayo

a) Producción de Il-1

Se realizaron cultivos de células mononucleares de sangre humana extraídas por gradiente de Ficoll-Hypaque. Estas células se incubaron durante una hora en medio de cultivo RPMI 1640 a 37°C en placas de 6 pozos con capacidad de 2 ml cada una conteniendo 4 x 10⁶ células. Al cabo de ese tiempo, se removieron por lavado las células no adheridas a la placa. Las células restantes, adheridas se cultivaron durante 24 horas a 37°C en medio de cultivo con 5% de suero humano AB (HABS) en presencia del mitógeno LPS a una concentración de 10 ng/ ml, y concentraciones de ΔHOP 10⁻⁴M y 10⁻⁵M y

de dexametasona $10^{-6}M$ y $10^{-7}M$. El sobrenadante se centrifugó, se dializó con membranas de poro de exclusión de peptidos de peso molecular entre 6 a 8 KD contra 150 volúmenes de PBS durante 48 horas y posteriormente contra 20 volúmenes de RPMI 1640 durante 24 horas. De esta forma la Il-1 de PM : 17000, quedó atrapada, eliminándose el mitógeno y los esteroides presentes en el medio de cultivo. Por último se congelaron los sobrenadantes a $-70^{\circ}C$ hasta el momento de realizar el bioensayo.

b) Bioensayo

Se utilizaron timocitos de ratón C3H/HeJ extraídos según la técnica descrita en el capítulo 1 pero en forma estéril. La técnica consistió en agregar diluciones de 1/10, 1/20, 1/40, y 1/80 del sobrenadante del cultivo de 24 horas a $2,5 \times 10^6$ células/ pozo cultivadas en RPMI 1640 con 5% de suero fetal bovino en presencia de 10 ug/ ml de PHA. Cabe destacar que se utilizaron placas de 96 pozos para realizar el bioensayo. Al cabo de 48 horas de cultivo a $37^{\circ}C$, se agregó 0,5 uCi de timidina- 3H a cada pozo y se continuó el cultivo 16 horas más. Por último las células se cosecharon en filtros de fibra de vidrio utilizando un cosechador de marca Nunc, y dichos filtros se secaron y contaron con tolueno centellante en un contador de centelleo. De esta manera se determinó el radioactivo incorporado a las células sabiendo que a mayor incorporación mayor cantidad de Il-1 segregada por los monocitos.

RESULTADOS

Efecto de Δ HOP y cortisol sobre linfocitos estimulados

Los resultados en la figura 4 muestran la respuesta a la PHA por las CMSP en presencia de concentraciones crecientes de Δ HOP o cortisol. En ella puede observarse que, en presencia de cortisol 10^{-9} M, el efecto inhibitorio sobre la incorporación de timidina- 3 H fue del 20%, aumentando al incrementar la concentración del esteroide llegando a un 90% de inhibición con cortisol 10^{-4} M. Delta HOP, en cambio, no tuvo ningún efecto a bajas concentraciones (10^{-9} M - 10^{-6} M), apareciendo recién un 20% de inhibición a 10^{-5} M y un máximo efecto con 10^{-4} M.

Como el efecto inhibitorio observado podría deberse a un efecto citolítico de los esteroides, y no a la inhibición de la síntesis de ADN, se determinó la viabilidad celular por azul trypan y por coloración con May-Grunwald-Giemsa el tipo de células presentes en los cultivos realizados en presencia de los esteroides. Los conteos celulares mostraron que a las distintas concentraciones de cortisol y Δ HOP, la viabilidad fue superior al 95%.

Por otro lado en los extendidos celulares no tratados con PHA (controles) se observaron células aisladas, no estimuladas. En cambio cuando las células estuvieron en presencia del mitógeno, hubo gran cantidad de acúmulos celulares de linfocitos y blastos. En el caso de los linfocitos estimulados en presencia de Δ HOP 10^{-4} M o cortisol (F) 10^{-4} M las células se observaron como las controles. Cuando las células se cultivaron en presencia de PHA y Δ HOP 10^{-6} M

se visualizaron acúmulos celulares, lo que indica que la estimulación no fue inhibida a esta concentración. Con cortisol se observó a mayor concentración una disminución del número de acúmulos y de blastos, indicando una inhibición en la estimulación.

El efecto de la PHA sobre CMSP preincubadas o no con $10^{-4}M$ de ΔHOP o cortisol (F) se muestra en la figura 5 : a) La acción mitogénica de la PHA fue igual en las células pretratadas o no con ΔHOP (no hubo inhibición), mientras que cuando esta se agregó a todos los cultivos junto con la PHA después de la preincubación un efecto inhibitorio muy marcado se mostró por igual en ambos grupos, b) Muestra que a pesar de la ausencia de cortisol se produjo una significativa inhibición en la incorporación de timidina que se hizo más marcada cuando el cortisol se agregó a los dos grupos después del lavado junto con la PHA.

Efecto de ΔHOP y dexametasona sobre la producción de Il-1

En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos en la valoración de la Il-1 por bioensayo. Delta HOP $10^{-4}M$ fue el esteroide que mayor inhibición produjo a todas las diluciones probadas con respecto a las células controles estimuladas sin esteroides, alcanzando en la primera dilución una inhibición del 67% mientras que ΔHOP $10^{-5}M$ inhibió un 36%. Concentraciones de dexametasona $10^{-6}M$ y $10^{-7}M$ tuvieron un efecto semejante, produciendo ambas una inhibición del 41% en la primera dilución.

ESTIMULACION LINFOCITARIA

Efecto de cortisol y Δ HOP

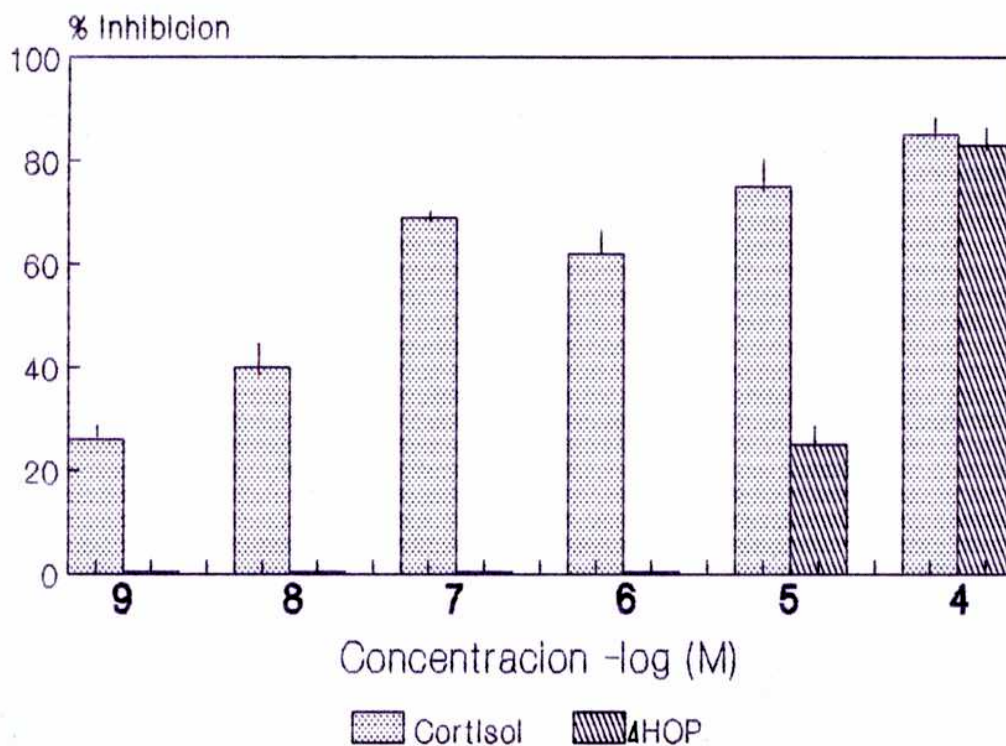


Fig.4. Efecto inhibitorio de Δ HOP y cortisol sobre la incorporación de timidina- 3 H en células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con 5 ug/ml de PHA durante 48 horas. Cada valor es el promedio \pm error standard de por lo menos seis determinaciones.

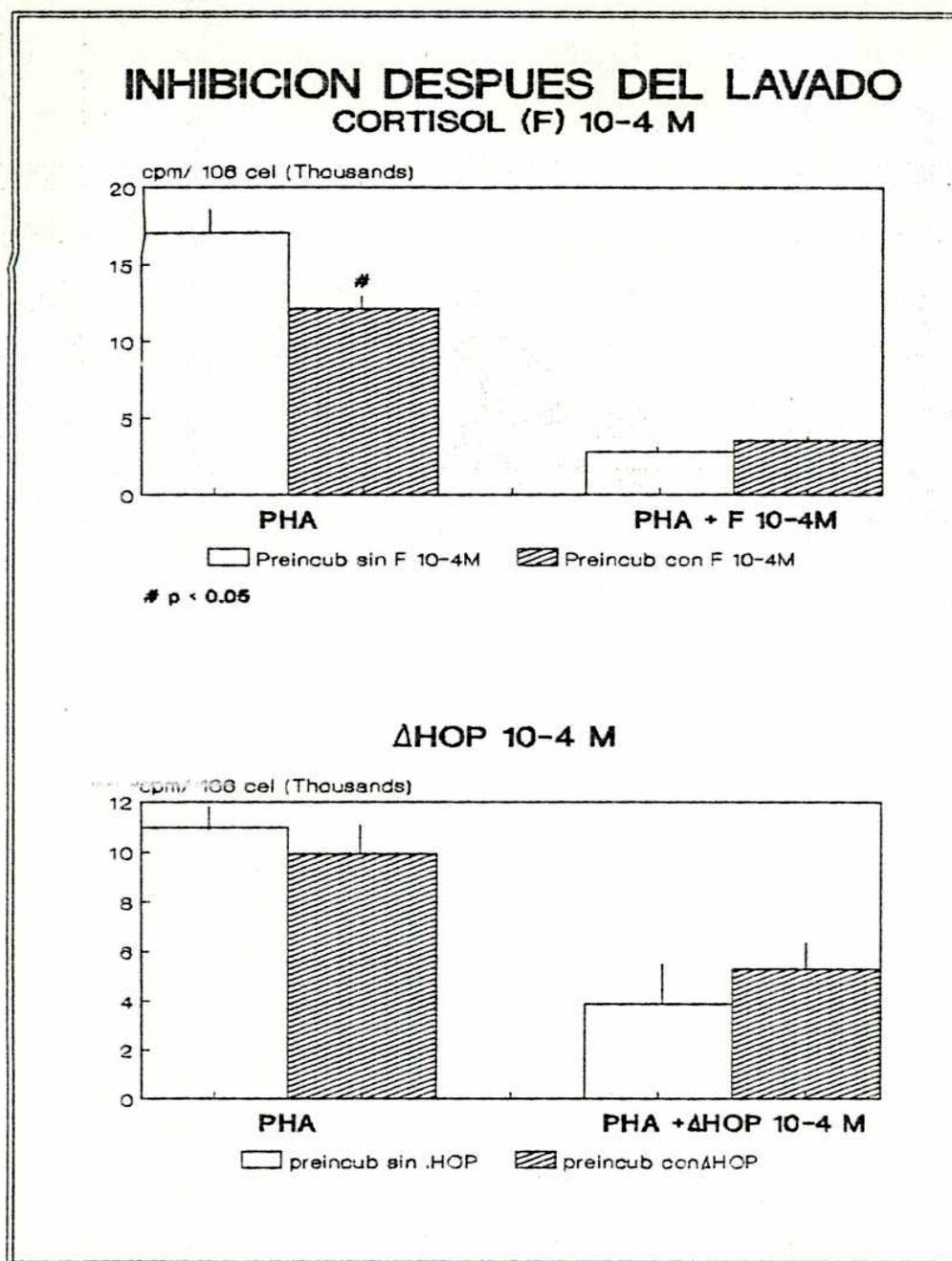


Fig.5. Efecto de Δ HOP 10^{-4} M y cortisol (F) 10^{-4} M sobre las células mononucleares de sangre periférica preincubadas o no con los esteroides.

Cada valor es el promedio + error standard de por lo menos seis determinaciones.

VALORACION DE IL-1

Bioensayo

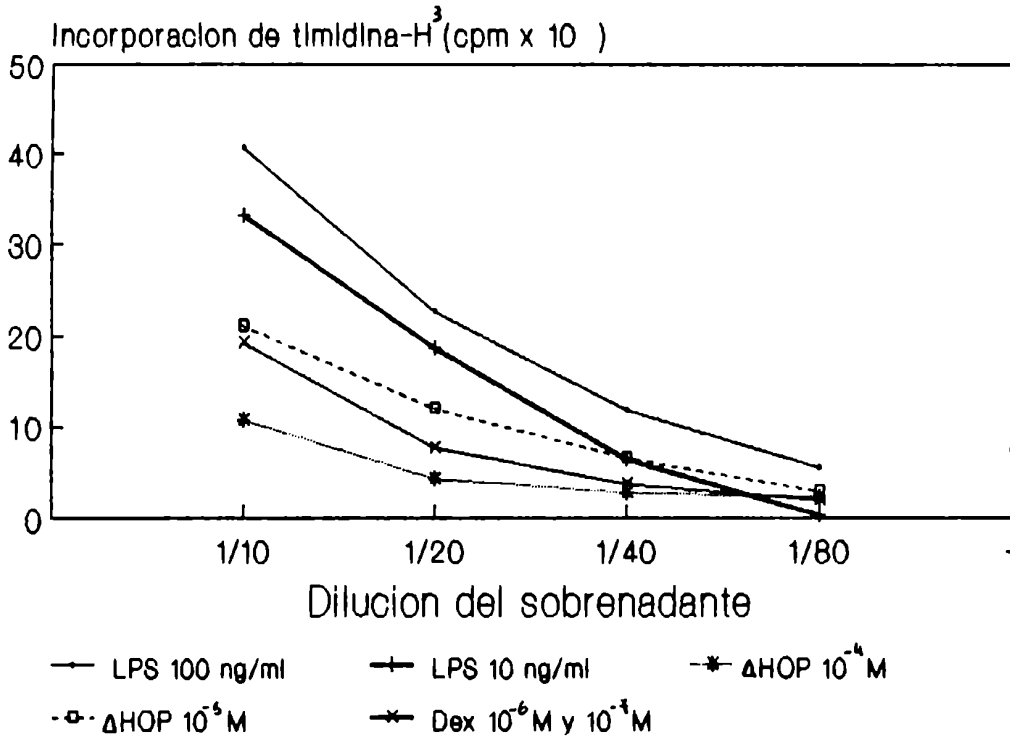


Fig.6. Valoración de Il-1 por bioensayo. Efecto de distintas concentraciones de Δ HOP y dexametasona (Dex) en la producción de Il-1 por los macrófagos. Las diluciones fueron de los sobrenadantes provenientes de la estimulación de los macrófagos por LPS que se agregaron al cultivo de timocitos en presencia de PHA.

DISCUSION

En concordancia con trabajos anteriores realizados con glucocorticoides (70, 71, 72, 73), en este capítulo se observa que el cortisol inhibió la acción mitogénica de la PHA en linfocitos humanos presentando una curva de saturación típica de los mismos. Se utilizó este esteroide y no dexametasona, por ser el glucocorticoide natural del hombre. Por el contrario, Delta HOP, no tuvo efecto a bajas concentraciones alcanzando la mínima inhibición con $10^{-5}M$ y la máxima con $10^{-4}M$, no presentando, en consecuencia la característica curva dosis-respuesta de los glucocorticoides. Dicha inhibición fue específica ya que cuando se incubaron CMSP con $10^{-4}M$ de pregnanodioldiona o 17 hidroxiprogesterona no se produjo ningún efecto inhibitorio. La inhibición de la incorporación de timidina- 3H observada en estos experimentos se debió a una inhibición en la proliferación y no a un efecto tóxico de los esteroides de acuerdo al recuento celular realizado después de 48 horas de cultivo y a los extendidos celulares, que mostraron una correlación directa entre el menor número de acúmulos y blastos con una disminución de la incorporación de timidina- 3H .

El potente efecto inhibitorio de ΔHOP $10^{-4}M$ en la proliferación linfocitaria se produjo solamente en presencia del esteroide, según lo demuestra la figura 5 en que se ve claramente que a pesar de estar ΔHOP 18 horas en contacto con las CMSP el efecto inhibitorio no se produce si esta es retirada antes de ser agregado el mitógeno. Por el contrario hay una marcada inhibición cuando se agrega con la PHA independiente de que las células fueran o no preincu-

badas con el esteroide. Todo lo contrario sucede con el cortisol, en este caso la presencia del mismo en los cultivos durante 18 horas previas a la estimulación, hace a las células menos sensibles a la acción mitogénica de la PHA aún cuando la hormona no se agrega después del lavado, lo que confirma la presencia de una proteína inhibitoria clásica del efecto glucocorticoide (74, 75). Estos resultados coinciden con los obtenidos por González et al.(22) en los que se demuestra que es necesaria la presencia de Δ HOP y no la de corticosterona en la inhibición de incorporación de uridina-³H por timocitos de rata.

Los resultados obtenidos en la producción de Il-1 por efecto de los esteroides sugieren que Δ HOP a altas concentraciones disminuye la producción de Il-1 en mayor grado que la dexametasona, teniendo en este caso un efecto inmunosupresor semejante a los glucocorticoides. Esta inhibición se traduce en una supresión de la producción de Il-2 dependiente de Il-1 y en consecuencia menos proliferación linfocitaria.

Estas observaciones concuerdan con trabajos realizados con cortisol a concentraciones entre 10^{-6} M a 10^{-4} M en los que se demuestra que suprime completamente la producción de Il-1 (66, 76, 77). Por otra parte, trabajos recientes han investigado más profundamente el mecanismo por el cual los glucocorticoides inhiben la producción de Il-1 y han demostrado que se produce por una disminución en la transcripción del gen de IL-1 y también en la estabilidad del ARN mensajero (78, 79); queda por aclarar si la acción de la Δ HOP sobre la Il-1 es mediada por el mismo mecanismo.

CAPITULO IV

ACCIONES COLATERALES

GENERALIDADES

Los efectos inmunosupresores y antiinflamatorios de la terapia con glucocorticoides y Δ HOP han sido discutidos en capítulos anteriores donde se realizó un estudio de dosis, perdurabilidad del efecto, potencia antiinflamatoria e inmunosupresora. Los glucocorticoides además de estos efectos actúan sobre otros tejidos teniendo por lo tanto una acción múltiple, la mayoría de ellas tóxicas.

Desde los años 30 se conoce el efecto antagónico que tienen los glucocorticoides con respecto a la insulina en el metabolismo de los hidratos de carbono (80). Estos, aumentan la gluconeogénesis hepática produciendo como consecuencia una disminución en la entrada de glucosa a los tejidos periféricos, un aumento de la misma en sangre y una acumulación de glucógeno en hígado (17, 81), lo que lleva a ultranzas a un estado diabético.

Además, es sabido que los glucocorticoides aumentan la excreción de potasio y estimulan la reabsorción de sodio produciendo un desbalance iónico (82); siendo importante por lo tanto medir la potencia sodio retentora de aquellos fármacos que se utilicen como inmunosupresores y antiinflamatorios.

En altas dosis, estos esteroides producen disminución del peso de órganos linfáticos como el timo, bazo y nódulos. La involución marcada del timo ha sido estudiada en detalle, en cuanto al bazo, poco se sabe de la susceptibilidad de los linfocitos a estos esteroides (83).

Otro de los efectos tóxicos es la atrofia de las glándulas suprarrenales, por inhibición de la liberación de ACTH con una consecuente disminución de la corticosterona circulante (84, 85).

En este capítulo se estudia la posible acción tóxica de Δ HOP con respecto a los glucocorticoides clásicos, midiendo la acumulación de glucógeno en el hígado, los pesos de órganos blanco, su potencia sodio-retentora y su efecto sobre la actividad del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal.

MATERIAL Y METODOS

Drogas y soluciones

El glucógeno de hígado de conejo utilizado como standard así como el reactivo de Krisman para la determinación de glucógeno fue provisto gentilmente por la Dra. Clara Krisman del Instituto de Investigaciones Bioquímicas. Este se prepara con 130 ml de solución saturada de CaCl_2 y 0,5 ml de 0,26 g de I_2 / 2,6 g IK en 10 ml de agua destilada.

Medición de la retención de Na^+ - K^+ en orina

Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 200 g de peso y se realizó una variación del modelo experimental utilizado por Damasco et al.(86) que consiste en :

Hora 0- Adrenalectomía bilateral bajo anestesia con éter,

Hora 18- Se les retira la comida (pellets de purina y se les coloca en la jaula una botella de solución fisiológica y otra de agua destilada para beber.

Hora 41- Las vejigas se vacían por presión.

- Se inyectan 2,5 ml de NaCl 0,9% subcutáneamente.

- Se inyectan las ratas en el cuadriceps derecho (intramuscular) con los esteroides disueltos en un solvente conteniendo 0,1 partes de etanol, 0,2 partes de propilenglicol y 3,7 partes de agua destilada.

- Se ligan los penes.

Hora 45,5- Bajo anestesia con éter la orina es extraída de la vejiga y los animales son sacrificados.

El Na⁺ y K⁺ en orina se mide mediante un fluorímetro de llama.

Determinación del efecto gluconeogénico en hígado

Se inyectaron ratones Balb/c de aproximadamente 20 g en forma crónica (según capítulo 1) con dosis de Dex 0,008 mg/100 g p.c., 4HOP 0,500 mg/100 g p.c. o vehículo. A las 5 horas de la última inyección se sacrificaron los animales y se extrajeron sus hígados. Se cortaron trozos de hígado de aproximadamente 200 mg, se les agregó 0,9 ml de KOH 33% y se calentó a 100°C durante 20 minutos. Al cabo de este tiempo, se agregó 1,5 ml de etanol 96% y se guardó a -4°C hasta obtener el precipitado de glucógeno (aproximadamente 8 horas). Este procedimiento se repitió hasta obtener un pellet blanco.

Se realizó primero una curva standard de glucógeno de la siguiente forma: a cada alícuota se agregó 100 ul de agua destilada, 100 ul de ClH 1N y 1,4 ml de reactivo de Krisman. Se midió en espectrofotómetro a 460 nm.

El mismo procedimiento se realizó también con los pellets obtenidos de los hígados de los ratones tratados y se comparó la deposición de glucógeno producida por dexametasona y .HOP.

Determinación del ACTH y corticosterona plasmática

Para ello se utilizaron ratas Sprague Dawley con tratamiento agudo según capítulo 1 que consiste en una inyección de 2 mg de Δ HOP o 0,033 mg de dexametasona o vehículo. A las 5 y 18 horas después de la inyección se sacrificaron los animales y se extrajeron muestras de plasma para dosar ACTH y corticosterona.

La medición del ACTH plasmático fue realizada por el Dr. Fernando Estivariz y la Dra. María Ines Morano de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de la Plata, utilizando la técnica de radioinmunoensayo (87).

La corticosterona plasmática fue determinada por el método fluorimétrico de Silber según se indicó en el capítulo 1.

Determinación del peso de órganos

Se realizaron tratamientos crónicos (detallado en el capítulo 1) utilizando ratones Balb/c de 20 g. A las 5 horas después de la última inyección se sacrificaron los animales y se extrajeron los timos, bazos y glándulas suprarrenales, los cuales se limpiaron y pesaron en una balanza Mettler.

RESULTADOS

La tabla 10 muestra los resultados obtenidos por la determinación de Na⁺ y K⁺ en orina de ratas tratadas en forma aguda con 4HOP u otros esteroides. Se observa que la aldosterona, mineralocorticoide clásico, fue el compuesto que provocó mayor reabsorción de Na y excreción de K⁺. Delta HOP resultó menos sodio-retentor que los otros corticoides probados (dexametasona y corticosterona) pero más que la progesterona.

En otro grupo de animales tratados de la misma forma se midió ACTH y corticosterona plasmática después de 5 y 18 horas de la inyección de 4HOP o dexametasona (figura 7). A las 5 horas se produjo una significativa disminución de ACTH y corticosterona plasmática tanto en los animales tratados con 4HOP como con dexametasona pero a las 18 horas, los valores de los animales tratados con 4HOP se recuperaron mientras que los tratados con dexametasona permanecieron por debajo del nivel normal. Estos resultados muestran que el efecto inhibitorio de 4HOP sobre la secreción de ACTH fue muy inferior al causado por dexametasona además de que los niveles de corticosterona plasmática se correlacionaron con las variaciones de ACTH.

Tabla 10. Efecto sodio-retentor de los esteroides

Compuesto	dosis/100g p.c.	Na ⁺ (mEq/litro)	% retención	Na ⁺ /K ⁺
Vehículo		8,77 ± 1,00	0	0,187
Progesterona	2mg	7,64 ± 0,81	13	0,095
ΔHOP	2mg	5,47 ± 1,43	38	0,071
Dexametasona	0,033mg	3,71 ± 0,01	58	0,061
Corticosterona	2mg	3,37 ± 0,67	62	0,040
Aldosterona	0,003mg	2,36 ± 0,89	74	0,021

Cada valor es el promedio ± error standard de un grupo de 6 animales.

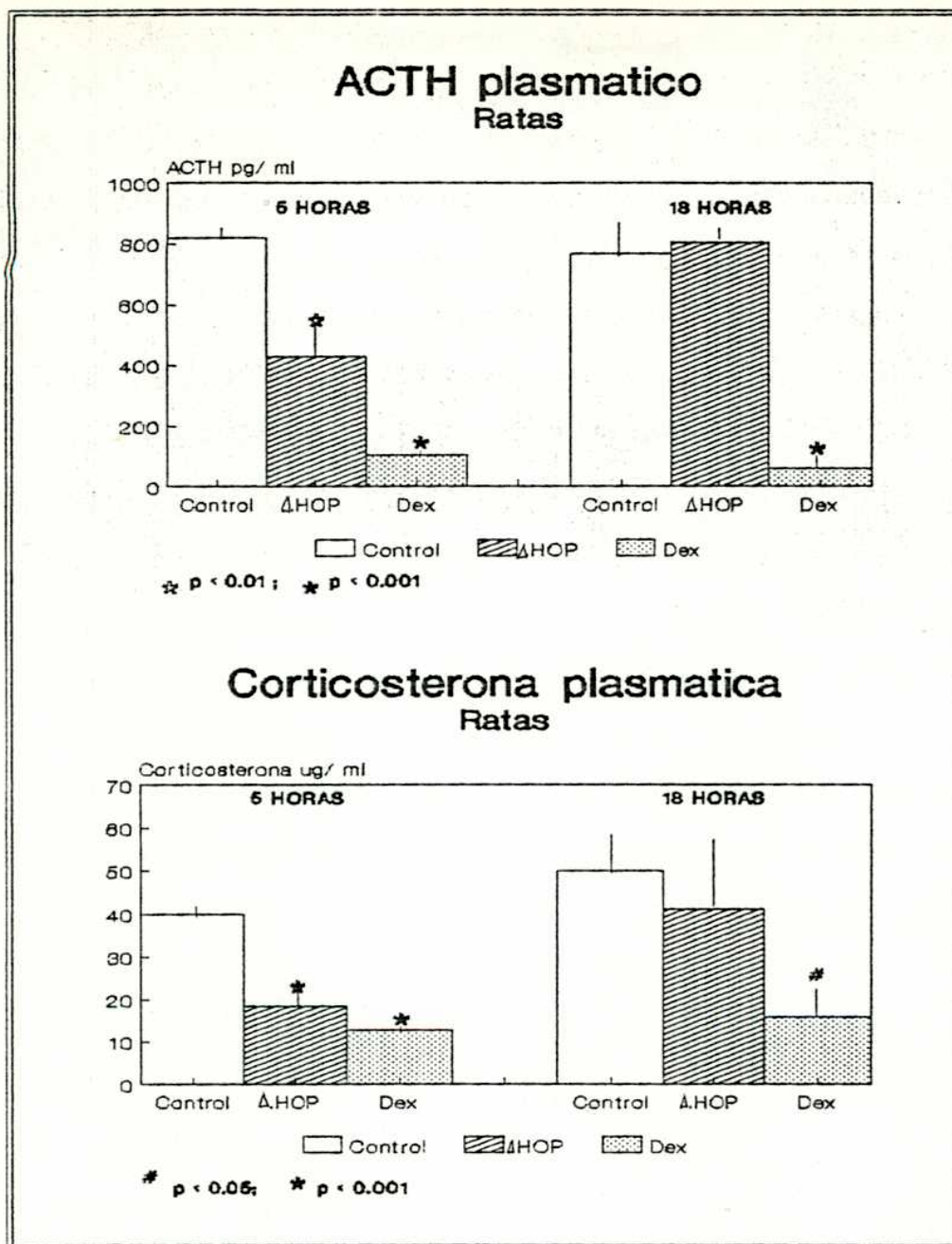


Fig.7. Efecto de ΔHOP y dexametasona (Dex) sobre el ACTH y la corticosterona plasmática después de 5 y 18 horas de la inyección.

Para corroborar que Δ HOP no afectaba considerablemente al eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal y tampoco el peso de órganos "blanco", se realizaron tratamientos crónicos en ratas y ratones con Δ HOP y dexametasona al cabo de los cuales se extrajeron y pesaron los timos, bazos y glándulas suprarrenales. En la figura 8 se observa que Δ HOP no modificó el peso de los mismos ni en ratas ni en ratones, mientras que dexametasona causó una disminución del peso de todos los órganos en ambos grupos de animales.

Para observar el efecto gluconeogénico de Δ HOP, en primer lugar, se realizó una curva standard de glucógeno cuyos valores se muestran en la figura 9. Los valores de glucógeno hepático se muestran en la tabla 11, en ella se observa que tanto la dexametasona como la Δ HOP aumentan el contenido del mismo con respecto a los controles.

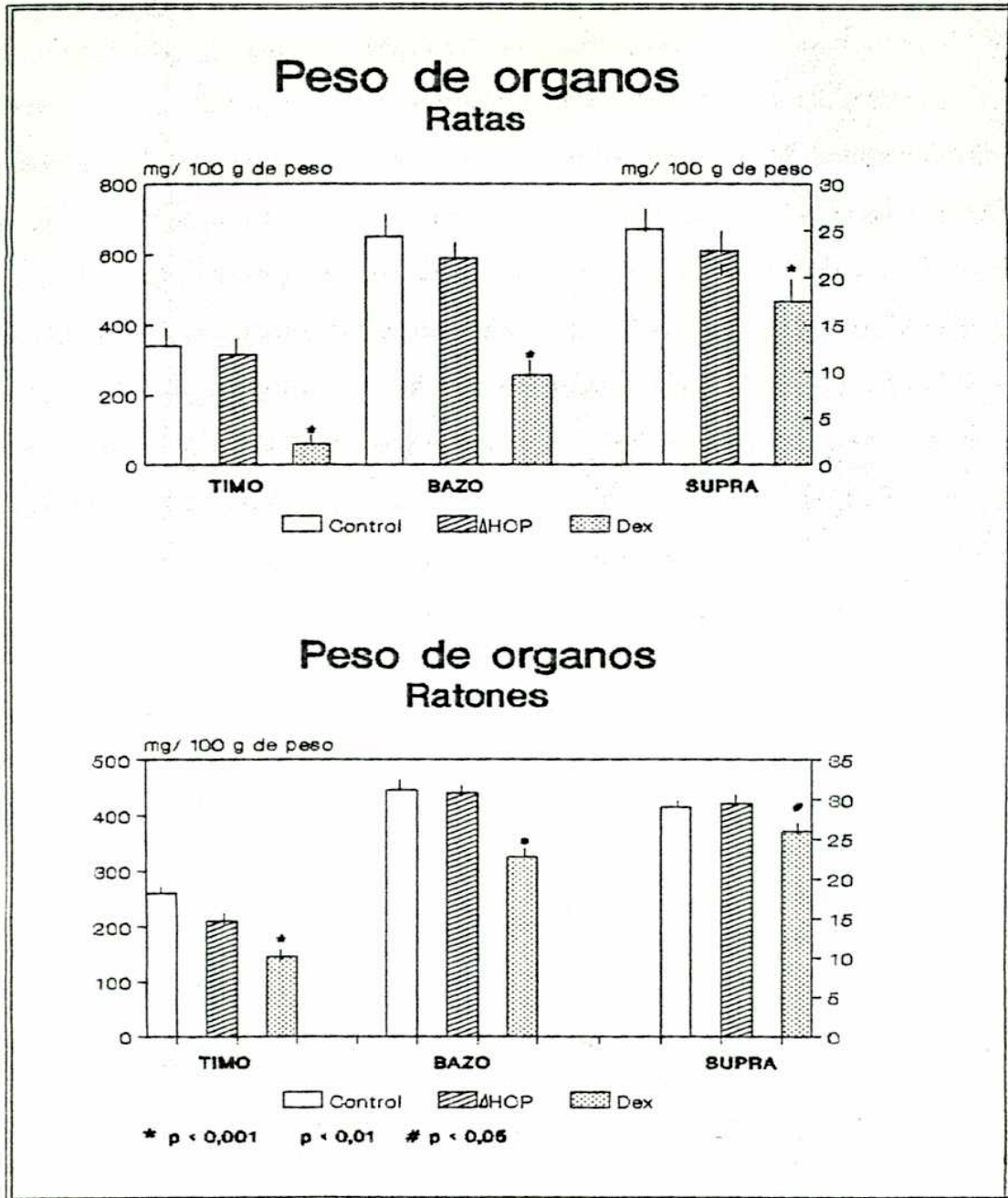


Fig.8. Efecto de Δ HOP y dexametasona (Dex) sobre el peso de órganos de ratas y ratones luego de un tratamiento crónico.

CURVA DE GLUCOGENO

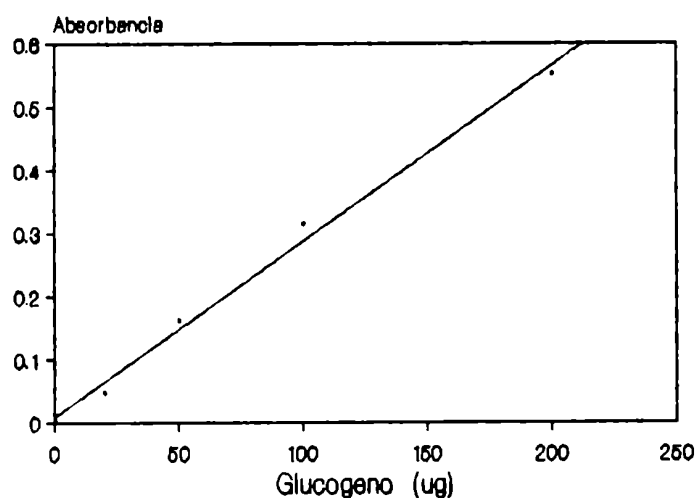


Fig.9. Curva standard de glucógeno.

Tabla 11. Efecto de Δ HOP y dexametasona (Dex) sobre el glucógeno hepático luego de un tratamiento crónico en ratones.

Tratamiento	n	ug glucógeno/ mg hígado
Vehículo	9	0,43 \pm 0,03
Δ HOP	10	0,58 \pm 0,06 *
Dex	5	0,64 \pm 0,22 *

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard.

Diferencias significativas respecto de los animales inyectados con vehículo : * $p < 0,05$ según test de Duncan's.

DISCUSION

Es sabido que dosis farmacológicas de glucocorticoides crean insuficiencia suprarrenal, bloquean la secreción de ACTH inducida por stress y causan cambios histológicos en la zona de la glomerulosa (88). Delta HOP produjo una disminución del ACTH y la corticosterona plasmática en ratas después de 5 horas de la inyección, recuperándose rápidamente a valores normales. Por el contrario, la dexametasona mantuvo estos valores bajos después de 18 horas de la inyección; como sucede con la corticosterona, 11 β -hidroxiprogesterona (89) y altas dosis de metilprednisolona (34, 40).

Es de notar, que según los resultados del capítulo 1, tanto en los tratamientos agudos como crónicos, Δ HOP no alteró los niveles de corticosterona, plasmática en los ratones, lo que no coincide con los resultados en ratas observados en este capítulo. Esta diferencia podría deberse a que las ratas son animales más sensibles a los glucocorticoides que los ratones, observándose una disminución pasajera de los niveles de ACTH y corticosterona en las tratadas con Δ HOP.

Corroboran estos resultados, el hecho de que Δ HOP no produjera atrofia de las glándulas suprarrenales luego de tratamientos crónicos tanto en ratas como en ratones. Por el contrario la dexametasona produjo una reducción del peso de estas glándulas indicando una insuficiencia suprarrenal, acción tóxica producida por la mayor parte de los corticoides utilizados en la clínica médica (89, 40).

Delta HOP tampoco afectó los pesos de los timos y bazos, diferenciándose así notablemente de los glucocorticoides clásicos (90, 91). También lo hacen con respecto al efecto sodio retentor que es significativamente menor. En cambio 4HOP actúa igual que los glucocorticoides en la síntesis de glucógeno.

De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que 4HOP carece de algunos efectos tóxicos importantes como son la atrofia de órganos e insuficiencia suprarrenal, teniendo en cambio un leve efecto en la secreción de ACTH y en la retención de Na'. Estos resultados la hacen valiosa desde el punto de vista farmacológico ya que muy pocos esteroides antiinflamatorios e inmunosupresores - carecen de estos efectos colaterales tóxicos (34, 40, 92).

CAPITULO V

MECANISMO DE ACCION

1) POLARIZACION DE FLUORESCENCIA

GENERALIDADES

La fluidez de la membrana celular juega un importante papel en el control de los mecanismos celulares (93), por ende una variación en ella puede producir cambios en los procesos de transporte (94) y en la transmisión de señales a través de la misma.

En este capítulo se estudia el efecto de ΔHOP en la fluidez de la membrana de timocitos, observando si modifica el entorno de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos.

Una técnica eficiente para evaluar las características dinámicas de las bicapas lipídicas de la membrana es la polarización de fluorescencia. Esta técnica se basa en que la fluorescencia emitida por las moléculas que están dispersas en un medio viscoso está parcialmente polarizada. Esto se expresa en términos de grado de polarización P , que se obtiene de la medida simultánea de I_{\parallel} / I_{\perp} y I_{\perp} , donde I_{\parallel} y I_{\perp} son las intensidades de fluorescencia detectadas a través de un polarizador orientado paralelo y perpendicular a la dirección de polarización de rayo de luz excitado (95). Los valores de las intensidades se relacionan para determinar el grado de polarización de fluorescencia de la siguiente manera:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} = \frac{I_{\parallel}/I_{\perp} - 1}{I_{\parallel}/I_{\perp} + 1}$$

Para realizar esta medición se incubaron timocitos en presencia de 1,6-difenil-1,3,5 hexatrieno (DPH) como hidrocarbano fluorescente, ya que sus características espectrales y su forma elongada lo hace más sensible a los cambios de fluidez y además le permite introducirse rápidamente en las bicapas lipídicas. Esto provee una medida del grado de rotación del fluoróforo en la membrana de los timocitos reflejando así la dinámica del interior de la misma (96).

El DPH, cuando es excitado, posee un grado de polarización de fluorescencia que se relaciona con la viscosidad de la membrana que se opone a las rotaciones del eje largo de la molécula del DPH. Este fluoróforo se une inespecíficamente a distintos sitios dentro de la bicapa, a lugares hidrofóbicos (97) o a las llamadas "capas de unión" de lípidos que rodean a las proteínas intrínsecas (98). Cuando el sistema lipídico se encuentra poco ordenado, las moléculas de DPH se enredan con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos y disminuye el grado de polarización (fig. 10); en cambio cuando está ordenado el fluoróforo puede alinearse paralelamente a estas cadenas y aumentar el grado de polarización (96).

Fig. 10. Ubicación de las moléculas de DPH entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 60 días de edad, las cuales fueron sacrificadas por decapitación. Se les extrajo el timo y se realizó una suspensión de timocitos en buffer TRIS según la técnica descrita en el capítulo I.

Las células (20×10^6 cel/ml) se incubaron en buffer TRIS durante 30 minutos a 37°C en presencia o ausencia de $\Delta\text{HOP } 10^{-4}\text{M}$ en un volumen final de 1 ml.

En una fracción de las muestras se determinó la incorporación de uridina- H^3 al ARN de timocitos; y en la otra, a una suspensión celular de 20×10^6 cel/ml se le agregó 2 μl de DPH $2 \times 10^{-3}\text{M}$ en tetrahidrofurano a (96), y se incubó durante 10 minutos a 25°C . Al cabo de ese tiempo, se midieron las intensidades de fluorescencia paralela y perpendicular (I_{\parallel} y I_{\perp}) y la polarización de fluorescencia a 340 nm en un fluorímetro SLM 4800 con un filtro de excitación Corning 7-51 y dos filtros de emisión KV-417.

Se debió reducir el período de exposición a la excitación a menos de 10 segundos debido a que las señales fluorescentes de sistemas que contienen DPH decrecen con el tiempo de exposición (99).

RESULTADOS Y DISCUSION

La incubación de los timocitos con DPH estuvo acompañada por un aumento de la polarización de fluorescencia que alcanzó un valor de aproximadamente 0.26 (Tabla 12). Valores semejantes fueron obtenidos por Shinitzky e Inbar (95) en incubaciones de linfocitos de nódulos linfáticos de roedores con 10^{-6} M de DPH a 25°C.

No se observaron diferencias significativas en los valores de polarización de fluorescencia entre las células incubadas con buffer Tris (controles) y aquellas incubadas con Δ HOP 10^{-4} M (Tabla 12), a pesar que este esteroide produjo un efecto inhibitorio del 43% en la incorporación de uridina- H^3 al ARN de los timocitos.

Estos resultados demuestran que Δ HOP 10^{-4} M no se intercala entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos de membrana, por lo que no modifica el entorno lipídico interno de la misma. Lo contrario sucede cuando por distintas técnicas se logra aumentar la relación colesterol-fosfolípido en la membrana (100); la inclusión del colesterol afecta el orden de las cadenas hidrocarbonadas, tendiendo estas a adoptar una configuración "trans", más ordenada, y por lo tanto aumentando la polarización de fluorescencia (101). Cambios en la composición de la membrana plasmática, ya sea en el contenido de colesterol, o fosfolípidos afectan el empaquetamiento de los lípidos y alteran su movilidad lateral, influyendo directamente sobre la fluidez de la misma.

Si bien Δ HOP, no se inserta en la bicapa lipídica podría anclarse en el borde superficial de las cabezas polares de los fosfolípidos, como lo sugieren Munck (102), Gershfeld (103) y Khaiat

(104) para otros esteroides; lo que concordaría con el hecho que el efecto de Δ HOP desaparece rápidamente con el lavado (22), lo que sugiere una unión lábil a la cara externa de la membrana.

En este caso, Δ HOP también se comportaría de distinta forma que los glucocorticoides. Según Keating (105), a concentraciones de 10^{-7} M a 10^{-6} M los glucocorticoides aumentarían la fluidez de la membrana en forma dosis-dependiente, esta acción se ejercería disminuyendo la cantidad de colesterol en la membrana (106) o produciendo cambios en la síntesis de otros lípidos como la esfingomielina o la lisofosfatidilcolina (107). Por otro lado, muchos estudios han demostrado que los glucocorticoides a altas concentraciones (10^{-3} M a 10^{-6} M) "estabilizarían" las membranas (108) al igual que el colesterol, intercalándose entre las cadenas hidrocarbonadas, aumentando la microviscosidad y produciendo un aumento de la polarización de fluorescencia si se evalúa con DPH, hecho que no sucede con 10^{-4} M de Δ HOP.

Tabla 12. Intensidades de fluorescencia de timocitos incubados con DPH en presencia o ausencia de 4HOP

<u>Muestra 1 Control</u>			<u>Muestra 2 4HOP</u>		
I_{\parallel}	I_{\perp}	Polariz.	I_{\parallel}	I_{\perp}	Polariz.
8459	5684	0.196	8533	5936	0.179
8483	5781	0.189	8626	5837	0.193
8517	5726	0.196	8592	5813	0.193
8480	5795	0.188	8640	5774	0.199
8520	5725	0.196	8595	5734	0.200
8537	5761	0.194	8725	5806	0.201
8556	5722	0.198	8737	5804	0.202
8560	5770	0.195	8682	5776	0.201
8505	5743	0.194	8687	5839	0.196
8169	5433	0.201	8761	5798	0.204
		$\bar{x} = 0.194$			$\bar{x} = 0.196$

Muestra 3

Muestra 4 ΔHOP

$I_{ }$	I_{\perp}	Polariz.	$I_{ }$	I_{\perp}	Polariz.
8391	5813	0.181	8265	5832	0.173
8328	5776	0.181	7993	5805	0.159
8906	5738	0.216	8361	5734	0.186
8591	5817	0.193	8474	5802	0.187
8566	5790	0.193	8502	6058	0.168
8531	5807	0.190	8357	5723	0.187
8595	5758	0.198	8155	5886	0.162
8574	5760	0.196	8461	5781	0.188
8625	5729	0.202	8556	5906	0.188
8665	5769	0.201	8693	5797	0.200

$x = 0.195$

$x = 0.179$

Muestra 5

$I_{ }$	I_{\perp}	Polariz.
8543	5029	0.258
8592	5055	0.259
8629	5043	0.259
8609	5054	0.262
8654	5057	0.260
8650	5057	0.262
8648	5056	0.262
8697	5105	0.262
8784	5157	0.260
8782	5139	0.260

$\bar{x} = 0.260$

Muestra 6

$I_{ }$	I_{\perp}	Polariz.
7645	4555	0.253
7617	4533	0.254
7660	4534	0.256
7699	4551	0.257
7713	4552	0.258
7728	4555	0.258
7752	4559	0.259
7776	4570	0.260
7786	4563	0.261
7793	4562	0.262

0.263

0.263

$\bar{x} = 0.260$

2) CAPPING EN TIMOCITOS

GENERALIDADES

Los resultados anteriores demuestran que Δ HOP no afecta el entorno lipídico de la membrana celular, pero existe la posibilidad que este esteroide se ancle sobre la superficie de la membrana y altere el movimiento lateral de las proteínas. Para probar este efecto, se realizaron pruebas de "capping" en timocitos incubados en presencia de glucocorticoides o Δ HOP.

El "capping" consiste en que uno de los componentes de la membrana celular se une a un ligando específico, se agrupa formando un "cap" en un polo de la célula (109). Este proceso requiere tanto de energía metabólica como de la interacción de actina y miosina (110).

Las características del proceso de capping indican que este no ocurre por una simple difusión de las macromoléculas de membrana, sino que requiere la interacción directa o indirecta de ellas con estructuras citoplasmáticas que causan su desplazamiento. Estas estructuras incluyen elementos contráctiles, presumiblemente sistemas de filamentos de actomiosina y microtúbulos (111).

Una de las técnicas existentes para determinar el "capping" es utilizando concanavalina A (Con A). Se ha observado que cuando linfocitos y timocitos de ratón son expuestos a esta lectina, ella se une a residuos de manosa en las cadenas laterales carbohidratadas de glicoproteínas de membrana formando el "cap" (112). De esta forma es posible evaluar la movilidad de los sitios receptores en la superficie de la membrana.

Existen diferentes drogas que provocan una inhibición del capping, las más utilizadas son la citocalacina B (Citoc B) que disrumpe los microfilamentos contráctiles (113), y la azida sódica que bloquea la formación de ATP intracelular (114). Ambos compuestos fueron utilizados en esta tesis para realizar una comparación entre el efecto producido por ellos y por los glucocorticoides.

MATERIAL Y METODOS

Drogas y soluciones

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	8,0	mM
Cl ₂ Mg.6H ₂ O	0,5	mM
Cl ₂ Ca	0,7	mM

La albúmina sérica bovina (BSA) fracción V, la concanavalina A (Con A) fluorescente y la citocalacina B (Citoc B) fueron de Sigma (St. Louis Mo). El paraformaldehído y el propil-galato fueron provistos por el Dr. Jorge Tezón.

Los demás compuestos utilizados fueron descriptos anteriormente.

Técnica de capping

La extracción de los timocitos de rata se realizó según la técnica descripta en el capítulo 1.

Los experimentos se realizaron con timocitos que se suspendieron en PBS con 0,2% de BSA (PBS/BSA) y se incubaron 30 minutos a 37°C. Se realizó luego la siguiente técnica: 100ul de la suspensión celular (2×10^7 cel/ml) se incubaron durante 30 minutos a 37°C con 20 ul de Con-A fluorescente en PBS/BSA, concentración final 160ug/ml.

Terminadas las incubaciones, se tomaron alícuotas de las distintas muestras y se realizaron los extendidos que se fijaron con paraformaldehído 2% posteriormente se lavaron 2 veces con PBS/BSA. El cubreobjetos se montó con una gota de propil-galato en glicerol y los preparados se guardaron a 4°C en oscuridad.

Todas las observaciones de capping con Con-A fluorescente fueron realizadas utilizando un microscopio de fluorescencia marca Zeiss.

Efecto "in vitro"

La inhibición del capping se realizó agregando a las células incubadas con Con A 10ul de Citoc B (10ug/ml) o azida sódica (30mM) según Petris (111). Las incubaciones con corticosterona (B) 10^{-4} M y Δ HOP 10^{-4} M se realizaron en PBS/BSA donde se disolvieron por sonicación.

Para corroborar la perdurabilidad del efecto de Δ HOP despues de su extracción, las células se incubaron a 37°C durante 30 minutos en presencia o ausencia de Δ HOP 10^{-4} M. Al cabo de ese tiempo las muestras se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se lavaron con 5 ml de PBS/BSA libre de esteroide. Estos timocitos se dividieron en dos grupos: a uno se le agregó 1 ml del buffer y al otro 1 ml de una solución de Δ HOP 10^{-4} M. La incubación continuó durante 120 minutos. Al cabo de ese tiempo, para observar la formación de caps se tomaron alícuotas de las incubaciones a las que se les agregó Con A fluorescente.

Efecto "in vivo"

Las ratas se sometieron a tratamiento crónico según se indica en el capítulo 1. A las 18 horas de la última inyección se sacrificaron los animales, se extrajeron y pesaron los bazo, timos, glándulas suprarrenales. Se realizaron incubaciones de timocitos para medir incorporación de uridina- H^3 según la técnica detallada en el capítulo 1 y se determinó el capping con Con A.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto "in vitro"

Cuando los timocitos fueron incubados con Con-A se formaron "caps" en un 65% de las células (Tabla 13, fig. 11); valor más alto que el observado por Petris (111) en estas células.

En la Tabla 13 se muestra que cuando estas células se incubaron con inhibidores del capping como la Citoc B o la azida sódica, se produjo una significativa disminución de células con "caps", observando la presencia de un anillo uniforme de fluorescencia en la mayor parte de ellas (fig. 12). El mismo fenómeno se produjo cuando se incubaron con Δ HOP 10^{-4} M, sólo el 27% de ellas formaron "caps"(fig. 13).

Por otro lado en las incubaciones con otro esteroide, corticosterona (B) 10^{-4} M, se observó una formación de caps en el 76% de las células, siendo significativamente menor a los valores alcanzados por Citoc B, azida o Δ HOP 10^{-4} M (Tabla 13, fig. 14).

Cuando se estudió el capping en timocitos preincubados con Δ HOP, lavados y reincubados con este esteroide, los resultados obtenidos (Tabla 14) indican que cuando Δ HOP permaneció en la incubación se produjo una significativa disminución de las células con "caps", observándose anillos uniformes de fluorescencia; pero cuando se lavaron las células con PBS y se reincubaron con este buffer el capping fue igual que en las células controles (preincubadas con PBS, lavadas y reincubadas con PBS) (fig. 15, 16).

Tabla 13. Capping de timocitos con concanavalina A fluorescente.
Efecto de distintos inhibidores.

Compuesto	n	% cél c/caps	% inhibición
Control	8	65,8 ± 2,3	
ΔHOP	7	27,4 ± 0,9 *	59
B	6	56,6 ± 2,4 #	24
Citoc B	5	36,5 ± 5,0 *	45
Azida	5	19,0 ± 3,0 *	72

Los resultados se expresan como promedio ± error standard.

Diferencias significativas respecto a los controles * p < 0,001,

p < 0,05.

Tabla 14. Capping en timocitos. Efecto de la preincubación
con ΔHOP 10⁻⁴M

Tratamiento	% cél con caps	% cél sin caps
Control	54	46
Preinc. ΔHOP + inc.PBS	58	42
Preinc. ΔHOP + inc.ΔHOP	23	77

Los tratamientos se detallan en material y métodos.

Los valores son promedios de tres determinaciones.

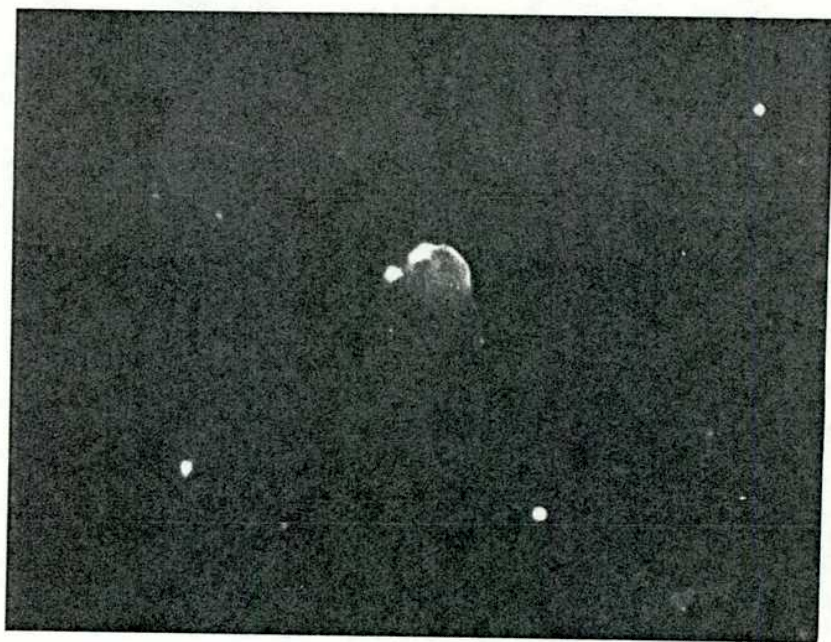
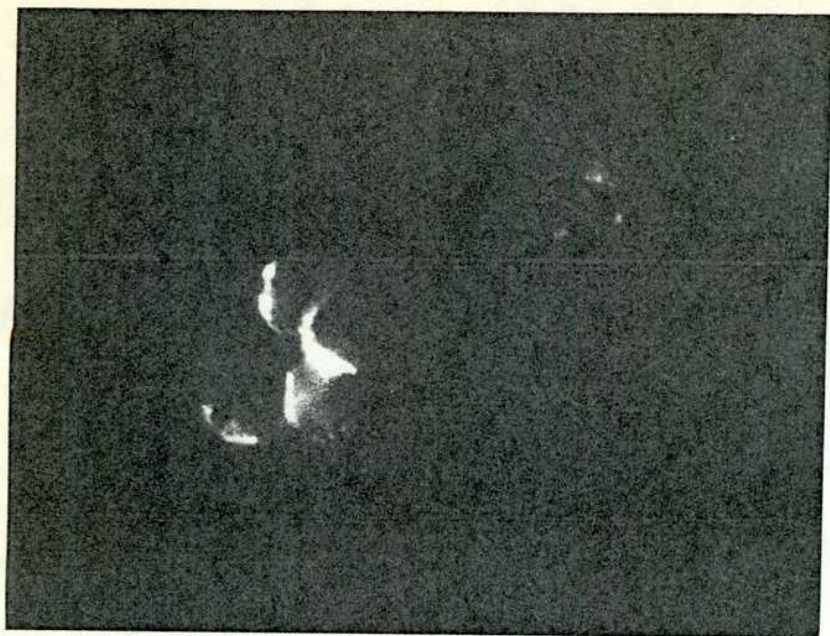
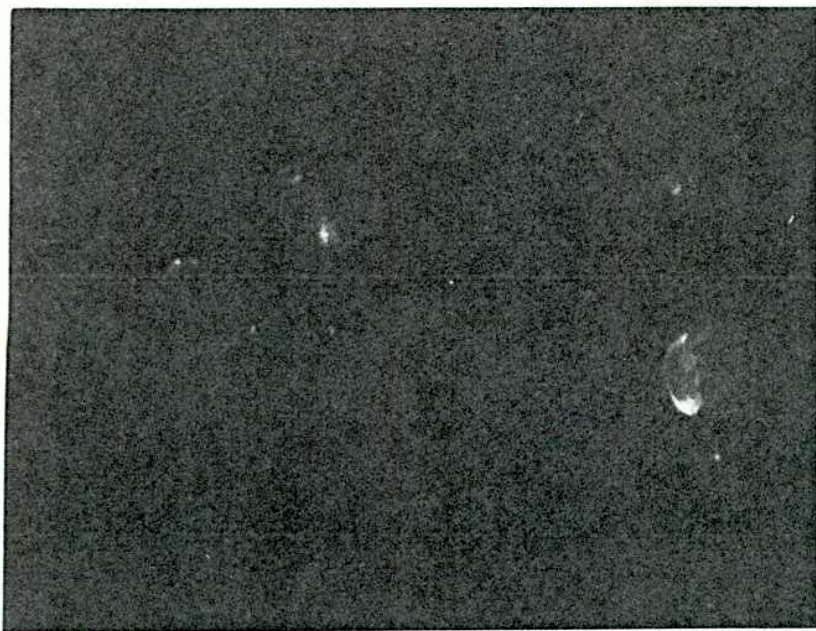


Fig. 11. Timocitos incubados con Con-A fluorescente durante 30 minutos a 37°C. Formación de caps.

a)



b)

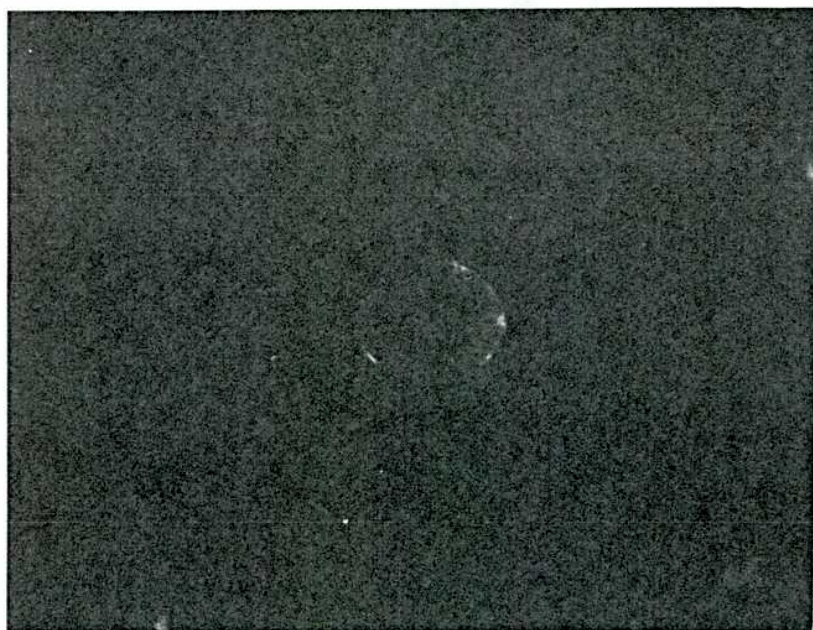


Fig. 12. Timocitos incubados con Con-A fluorescente, en presencia de azida sódica (a) o citocalacina B (b).

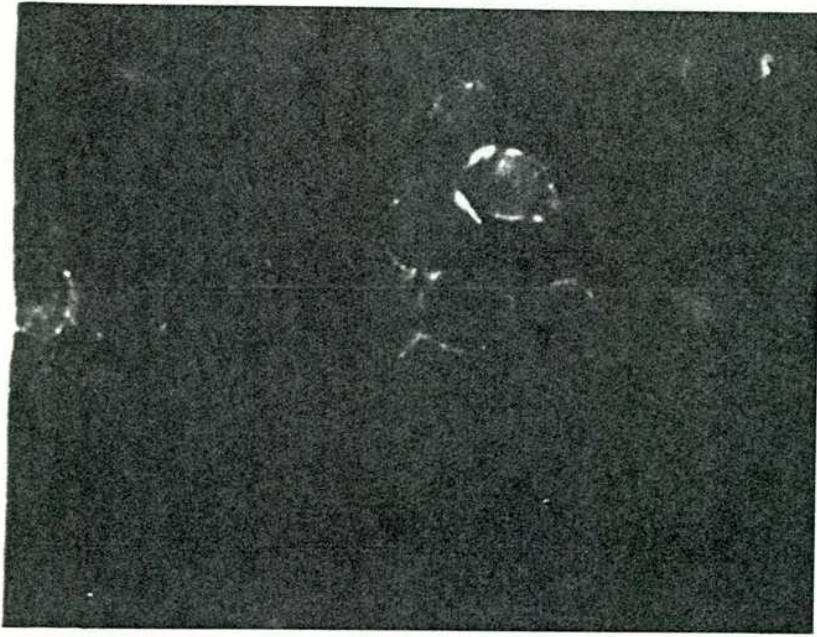


Fig. 13. Timocitos incubados con Con-A fluorescente y Δ HOP 10^{-4} M.

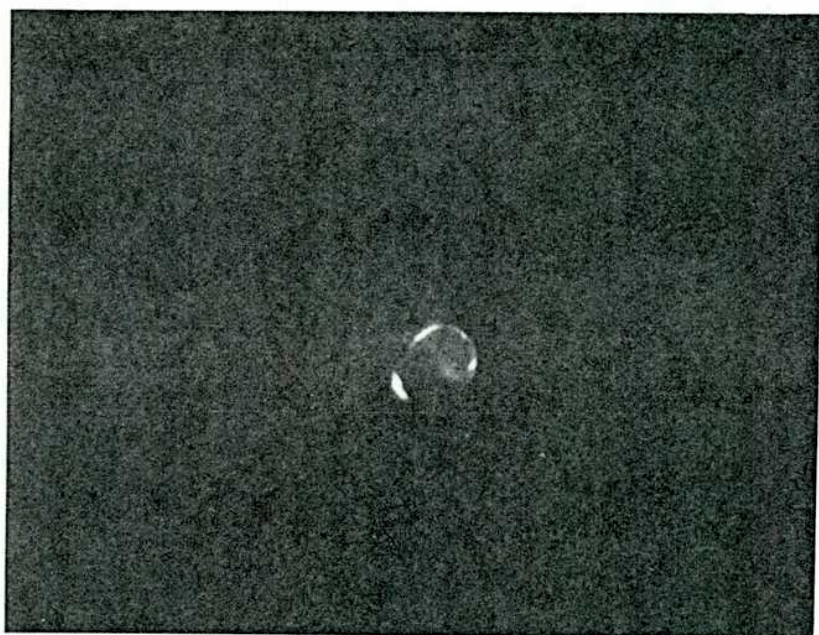
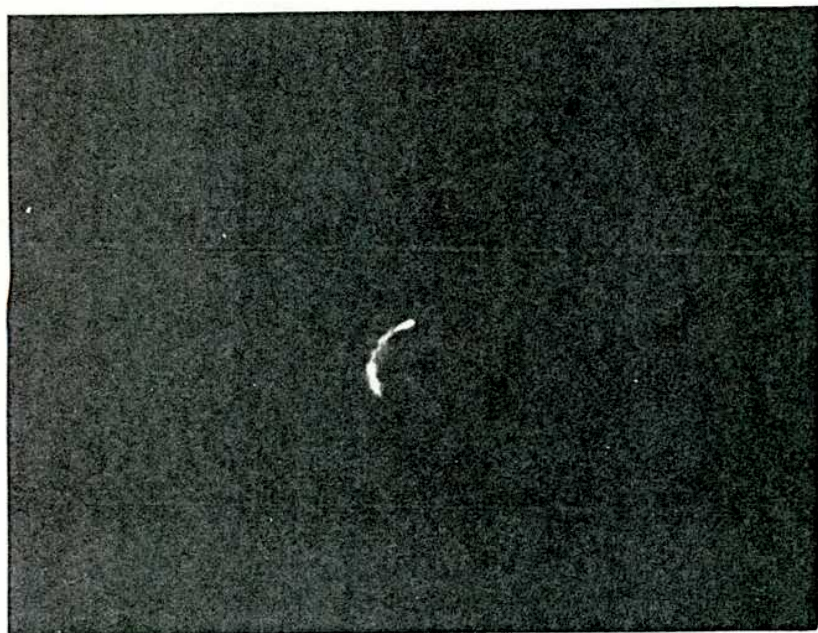


Fig. 14. Timocitos incubados con Con-A fluorescente en presencia de corticosterona 10^{-4} M.



Fig. 15. Capping en timocitos pre-incubados con Δ HOP, lavados, y reincubados con este esteroide.



a)

b)



Fig. 16. Capping en timocitos pre-incubados (a) o no pre-incubados (b) con Δ HOP, lavados y reincubados con buffer.

Estos resultados confirman trabajos anteriores (22) en que se afirma que es necesaria la presencia de Δ HOP para tener efecto biológico, en este caso la inhibición del capping, sugiriendo que este efecto es mediado por cambios en las propiedades de la membrana inhibiendo la movilidad de las proteínas y no por una acción hormonal, como lo demuestra Ashman con otros esteroides (115).

Efecto "in vivo"

Para determinar si este efecto de Δ HOP en la membrana sucedía también "in vivo", se inyectaron ratas con Δ HOP o dexametasona según se describe en material y métodos.

Las ratas inyectadas con dexametasona presentaron una gran involución de los bazos (61%) y timos (82%), debido a esto los timocitos obtenidos fueron muy escasos y no se pudo determinar la incorporación de uridina- H^3 . (Tabla 15). Sin embargo, en los pocos timocitos viables no se observó alteración del capping con respecto a las células pertenecientes a las ratas controles (fig. 17, 18) observando un 60% de células con caps.

En la Tabla 15 se muestra que Δ HOP produce una alta inhibición en la incorporación de uridina- H^3 correlacionada con una fuerte inhibición en el capping.(fig. 19)

Estos resultados sugieren que el mecanismo de acción de Δ HOP tanto "in vitro" como "in vivo" se produciría a través de una interacción del esteroide con las proteínas de la membrana plasmática. Este mecanismo no sería a través de la unión a micro-

túbulos y microfilamentos como en el caso de la citocalasina B (5), que al contrario de Δ HOP, produce la muerte celular después de tres horas de incubación (observación realizada en el laboratorio). También se descarta el mecanismo de la azida por su alta toxicidad.

Tabla 15. Efecto "in vivo" de ΔHOP y dexametasona (Dex) en el capping de timocitos, peso de órganos e incorporación de uridina luego de un tratamiento crónico.

RATA	TIMO (mg cada 100 g p.c.)	BAZO	SUPRAS	INHIB. INCORPORAC. URIDINA-H ³	% CEL C/CAPS
Control	342,8	699,1	25,2	0	62
Control	355,4	624,8	23,5	0	59
Control	316,4	620,2	24,6	0	67
ΔHOP	410,3	607,9	22,2	50 %	35
ΔHOP	329,5	503,1	19,5	33 %	36
ΔHOP	313,2	518,3	21,4		13
Dex	66,2	258,4	17,2		64
Dex	58,4	255,2	19,1	--	60

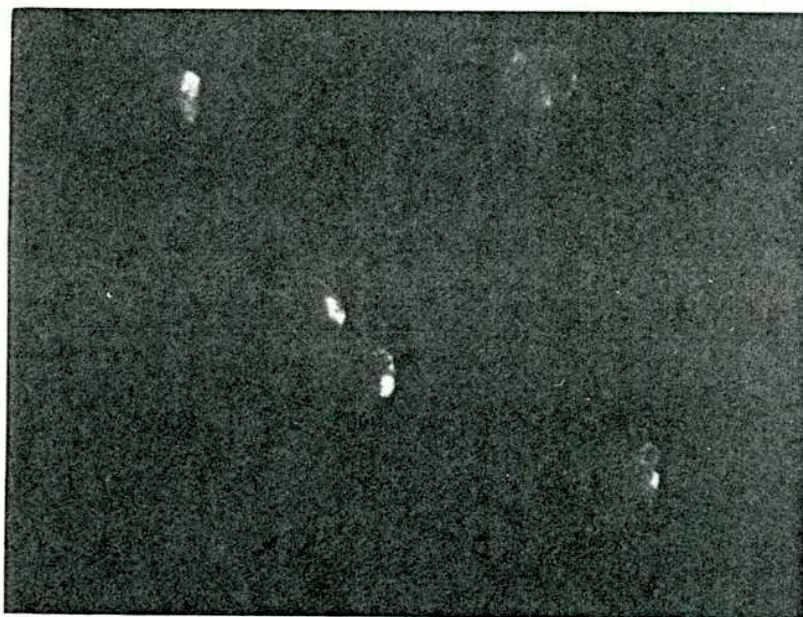


Fig. 17. Capping en timocitos de ratas tratadas con vehículo,
controles.



Fig. 18. Capping en timocitos de ratas tratadas con dexametasona.

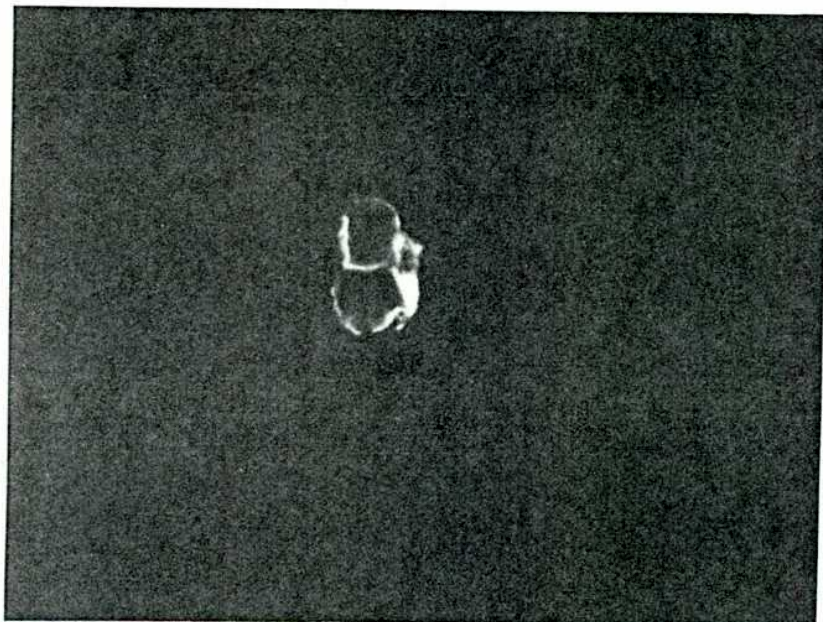


Fig. 19. Capping en timocitos de ratas tratadas con Δ HOP.

3) AFINIDAD DE Δ HOP POR LOS RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES

GENERALIDADES

Los resultados de este capítulo sugieren que el mecanismo de acción de Δ HOP tanto "in vitro" como "in vivo", se produciría a través de una interacción del esteroide con las proteínas de la membrana plasmática, sin alterar el entorno lipídico. Este mecanismo sería distinto al clásico de los glucocorticoides ya que estos actúan mediante un mecanismo genómico dependiente de una unión con receptores proteicos citosólicos (116, 117), en este caso existe una correlación directa entre la unión de la hormona a su receptor y la inducción de la respuesta biológica (118).

No siempre se respeta esta correlación entre dosis-número de receptores ocupados, por ejemplo en tratamientos para evitar la isquemia de las células nerviosas después de accidentes, la dosis endovenosa de metilprednisolona utilizada es muy superior a la necesaria para saturar los receptores (119, 120). Esto indicaría que en tratamientos farmacológicos los glucocorticoides podrían actuar en dos formas distintas, una a través de su receptor y otra en dosis muy elevadas sobre la membrana celular (121, 122).

De acuerdo a estas consideraciones se decidió investigar la afinidad de Δ HOP por el receptor de glucocorticoides en timocitos de rata para ver si además del efecto en la membrana plasmática se unía a dicho receptor.

MATERIAL Y METODOS

Determinación de la unión de dexametasona-³H en timocitos enteros de ratas

La determinación de la unión total de dexametasona-³H (Dex-³H) se realizó por triplicado de acuerdo con la técnica de Sibley y Tomkins (123) que consiste en incubar 1 ml de suspensión de timocitos de ratas adrenoprivas en RPMI 1640 (3×10^7 cel/ml) en tubos de vidrio siliconizados, en presencia de Dex-³H (6,7-³H N, New England Nuclear, Boston, M.A.), a 37°C durante 45 minutos con agitación suave en una atmósfera de 95% O₂ y 5% CO₂. Para determinar la unión no específica se incubaron idénticas alícuotas en presencia de un exceso 1000 veces mayor de Dex no radioactiva. Para obtener la curva completa de saturación se agregaron cantidades crecientes de Dex-³H.

Al finalizar la incubación las células se enfriaron, se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 100 g y lavaron una vez con 5 ml de PBS a 25°C para sacar el radioactivo citosólico no unido al receptor, y dos veces con 2 ml del mismo buffer a 4°C. El pellet final se resuspendió en 0,2 ml de PBS y se contó en tolueno centelleante conteniendo 30% de Triton X-100, en un contador de centelleo líquido.

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

RESULTADOS Y DISCUSION

La unión específica de Dex-³H luego de 40 minutos de incubación fue dependiente de la concentración de la hormona y se alcanzó la saturación con 3×10^{-8} M siendo la unión no específica aproximadamente el 45% de la total coincidiendo con el trabajo de Roldán y Castillo (124), fig. 20.

Es generalmente aceptado que la capacidad de los esteroides para competir con la Dex-³H es una medida de la afinidad por el receptor. De acuerdo a ello se incubaron timocitos con 5×10^{-8} M de Dex-³H que se desplazó con concentraciones crecientes de Dex no radioactiva o Δ HOP; corticosterona (B), progesterona (P) y testosterona (T) que se usó solamente a la máxima concentración. La cantidad de Dex-³H incorporada a la célula en ausencia de hormonas no radioactivas se consideró 100% de hormona unida al receptor.

En la figura 21 se observa que si bien la Dex a bajas concentraciones 5×10^{-8} M desplazó más que la Δ HOP, a mayores concentraciones 10^{-6} M- 10^{-5} M, ambas desplazaron igual como también lo hicieron corticosterona y progesterona, mientras que testosterona no demostró afinidad por el receptor. Llama la atención que Δ HOP a la mayor concentración haya desplazado más que la Dex.

El hecho de que Δ HOP tenga afinidad por el receptor no es sorprendente ya que en trabajos anteriores (1) se observó que Δ HOP 10^{-6} M y 10^{-5} M inhibe la incorporación de uridina-³H por timocitos de rata "in vitro" teniendo además efecto citolítico (18). Es sabido que aquellos esteroides con doble enlace en el anillo A como la progesterona, a altas concentraciones tienen efecto glucocorticoide por unirse al receptor de los mismos.

El efecto de Δ HOP a la mayor concentración (10^{-4} M), en que desplaza del receptor a la Dex- 3 H a pesar de la gran afinidad que esta tiene por el mismo, es difícil de explicar. Especialmente sabiendo que la unión inespecífica de los esteroides en general nunca es menor del 40%, en este caso el de Δ HOP fue menor que el 20%, lo que hace suponer un comportamiento anómalo del esteroide cuando se encuentra a concentraciones 10^{-4} M. De acuerdo a lo observado en esta tesis y en trabajos anteriores (22) se puede inferir que el efecto biológico de Δ HOP 10^{-4} M no es mediado por los receptores de glucocorticoides, hecho que no acontece a concentraciones más bajas.

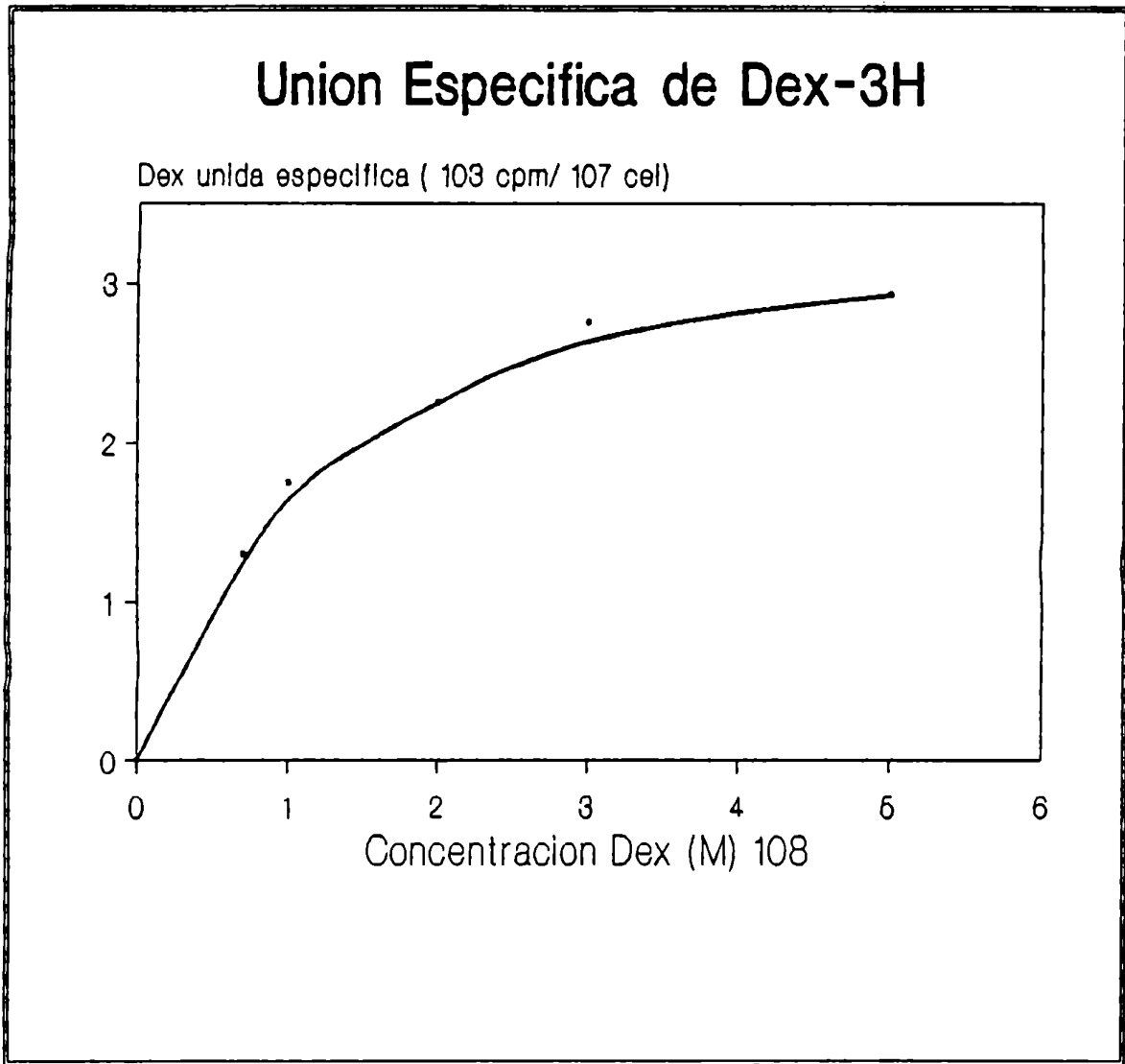


Fig. 20. Unión específica de Dex-³H (10^{-8} M a 5×10^{-8} M) luego de 40 minutos de incubación a 37°C, en timocitos de ratas.

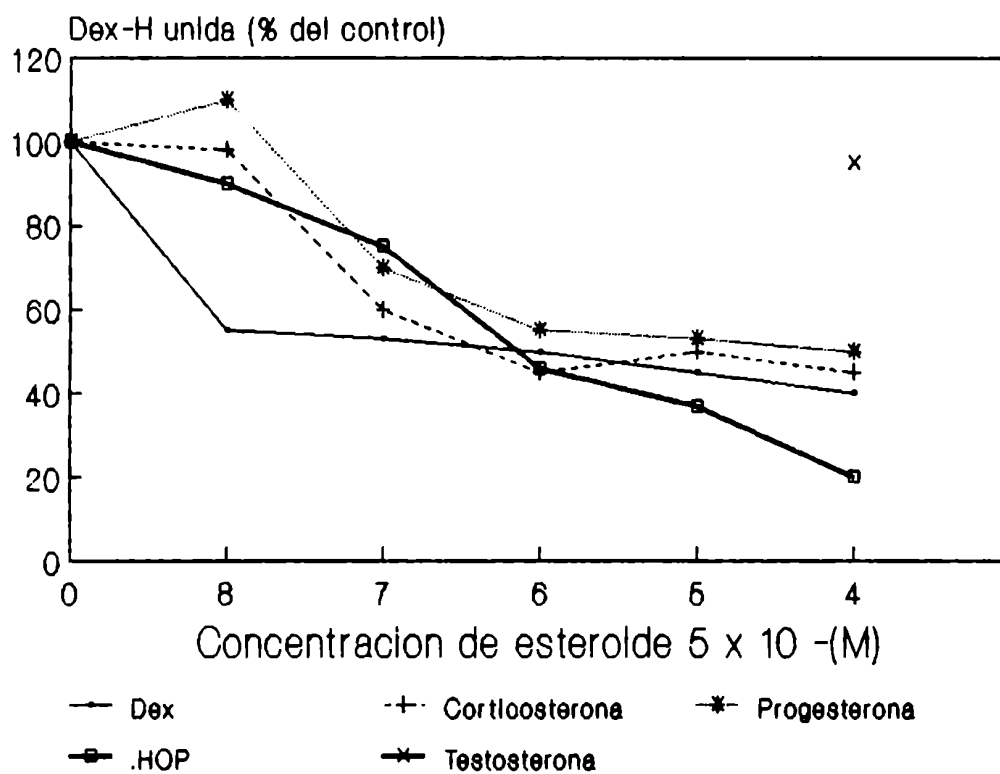


Fig. 21. Desplazamiento de la unión de Dex- 3 H por Dex no radioactiva y otros esteroides en timocitos de rata.

DISCUSION GENERAL

Los experimentos "in vivo" demuestran que Δ HOP es un potente inmunosupresor debido a su acción inhibitoria en la incorporación de uridina en el timo, su capacidad antiinflamatoria y su efecto inhibitorio en la proliferación linfocitaria. Estas acciones se diferencian de las producidas por los glucocorticoides entre otros aspectos por la mayor perdurabilidad del efecto de Δ HOP con respecto al de los glucocorticoides, y la acción reversible sobre la inhibición de la proliferación linfocitaria, siendo este efecto semejante al observado en timocitos de rata "in vitro", por lo tanto del tipo "no genómico" (22).

Uno de los mecanismos por el cual aparentemente Δ HOP produciría la inmunosupresión sería por la disminución de la producción de IL-1 por los macrófagos estimulados. Como ya es sabido, la IL-1 induce en los linfocitos T helper la producción y secreción de IL-2 (62, 63), necesaria para el crecimiento y proliferación de los linfocitos. En otro aspecto, la IL-1 es un factor importante como mediador de la inflamación y de la degradación celular; esta acción se realiza por aumentar la producción de ácido araquidónico, al activar la fosfolipasa A_2 y en consecuencia estimulando la secreción de prostaglandinas E_2 en distintos tipos de células (125, 126), además de aumentar la secreción de histamina y de otros mediadores de la inflamación (127). En consecuencia Δ HOP actuaría como antiinflamatorio inhibiendo la producción de IL-1 por los macrófagos la que actuaría a dos niveles : 1) disminuyendo la producción de ácido araquidónico y 2) disminuyendo la estimulación linfocitaria.

La posible acción tóxica de Δ HOP también fue considerada en este estudio. El punto más destacado al respecto fue la normalidad del funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisiario-suprarrenal como

lo indican los niveles normales de ACTH y corticosterona plasmática, así como el peso de las glándulas suprarrenales después de un tratamiento crónico con Δ HOP. Además de ello, no se observaron cambios en los pesos de bazo y timos y si bien Δ HOP tuvo efecto sodio-retentor este fue mucho menor que el producido por los glucocorticoides.

El aumento del glucógeno hepático semejante al producido por dexametasona hace pensar que a nivel metabólico la acción de Δ HOP sería semejante al de los glucocorticoides aunque esto es un hecho aislado que necesitaría más estudio.

Se debe destacar que los tratamientos crónicos realizados con Δ HOP fueron de un corto período, en relación a los tratamientos que se realizan en la terapia de ciertas enfermedades crónicas que duran meses. Durante ese corto tiempo, Δ HOP resultó menos tóxica que los glucocorticoides utilizados, queda ahora en manos de los farmacólogos probar este compuesto durante un período más prolongado.

En cuanto al mecanismo de acción de Δ HOP, con respecto a la afinidad de la misma por el receptor de glucocorticoides, los resultados obtenidos sugieren que debido a su estructura molecular, a concentraciones entre $10^{-7}M$ - $10^{-6}M$ este esteroide se uniría al receptor siendo por lo tanto los fenómenos biológicos a estas concentraciones de carácter genómico. A dosis suprafarmacológicas como es $10^{-4}M$ el gran desplazamiento que produce de dexametasona- 3H es difícil de explicar, pero la relación directa que se observa entre las altas dosis del esteroide con la inhibición de la movilidad de las proteínas de la membrana plasmática indicarían la necesidad de

saturar esta membrana para obtener un efecto biológico, efecto que desaparece junto con el que se produce sobre la membrana cuando .HOP deja de estar en contacto con las células, por lavado de las mismas.

Recientemente numerosos investigadores han observado que otros esteroides incluyendo los glucocorticoides a altas concentraciones actuarían sobre la membrana plasmática (119, 120, 128). Es así que altas concentraciones de glucocorticoides causarían un efecto protector sobre el sistema nervioso central, actuando como antiperoxidantes lipídicos, este efecto contrasta con las características de un mecanismo genómico mediado por receptor (12, 13, 14).

En conclusión de acuerdo a los resultados obtenidos, se podría afirmar que 4HOP a altas concentraciones actuaría a través de la membrana plasmática produciendo un efecto inmunosupresor semejante a los glucocorticoides pero con menos efecto tóxico. Queda ahora por realizar estudios farmacológicos más exhaustivos para saber feacientemente si este esteroide es posible de aplicar en la clínica médica.

RESUMEN

Considerando que a pesar de la semejanza en la estructura química de Δ HOP con respecto a los glucocorticoides, este esteroide produjo una inhibición de la síntesis de ARN en timocitos de rata "in vitro" mediante un mecanismo de acción no genómico distinto al de los glucocorticoides, se resolvió probar sus efectos biológicos "in vivo".

En el tratamiento agudo Δ HOP produjo su máximo efecto en la inhibición de incorporación de uridina por los timocitos 18 horas después de la inyección, desapareciendo a las 24 horas; mientras que en el tratamiento crónico el máximo efecto se produjo a las 5 horas manteniéndose invariable durante las restantes 30 horas, no observándose variaciones en los valores de corticosterona plasmática en ninguno de los dos casos. Por otro lado, la dexametasona tanto en forma aguda como crónica produjo la máxima inhibición a las 5 horas de la última inyección, desapareciendo completamente el efecto a las 24 horas manteniendo los niveles de corticosterona plasmática por debajo de los valores normales.

Tratamientos agudos y crónicos con Δ HOP indicaron que este esteroide tuvo acción antiinflamatoria con una potencia similar a la dexametasona, tanto por vía inyectable, oral y tópica. Además en estos experimentos se observó que Δ HOP no producía leucopenia, en comparación con dexametasona que disminuyó notablemente el número de linfocitos, monocitos y eosinófilos circulantes.

Los cultivos realizados con células mononucleares de sangre humana periférica estimuladas con phitoheмоaglutinina, demostraron la capacidad inmunosupresora de Δ HOP a altas concentraciones

($10^{-4}M$). Este esteroide inhibió la estimulación linfocitaria mediante un mecanismo no genómico, semejante al observado "in vitro" en timocitos de rata y también inhibió la producción de Il-1 por los macrófagos, lo que explica su potente acción inmunosupresora y antiinflamatoria.

Se estudió también su posible acción tóxica en animales tratados en forma aguda y crónica y se determinó que en relación al efecto tóxico de los glucocorticoides, no hubo cambios en los pesos de órganos sensibles a estos esteroides tales como timo y bazo; no afectó al eje hipotálamo-hipofisiario, por no alterar los niveles de ACTH plasmático ni el peso de las glándulas suprarrenales. Además el efecto sodio-retentor fue significativamente menor al producido por otros glucocorticoides y produjo un aumento de glucógeno hepático similar al producido por dexametasona. Todo ello demuestra que este nuevo esteroide tendría los efectos tóxicos muy atenuados con respecto a los glucocorticoides.

Finalmente para comprobar si el efecto de ΔHOP a altas concentraciones se producía por un mecanismo no genómico a través de la membrana plasmática, se realizaron en timocitos de rata pruebas de polarización de fluorescencia, para observar si el esteroide producía cambios en las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos y "capping" de las proteínas de superficie de la membrana.

En el primer caso, el esteroide no modificó el entorno lipídico de la membrana y en el segundo, impidió la movilidad de las proteínas de membrana tanto "in vivo" como "in vitro", en este último el efecto desapareció al ser lavadas las células. Además se observó una afinidad semejante a la corticosterona con respecto al receptor de glucocorticoides a concentraciones entre $5 \times 10^{-8}M$ a

5 x 10⁻⁶M, lo que sugeriría que a bajas concentraciones este esteroide actuaría mediante un mecanismo mediado por receptor, y a altas concentraciones (10⁻⁴M) lo haría a través de la membrana.

En conclusión de acuerdo a los resultados obtenidos se puede afirmar que Δ HOP a altas concentraciones actuaría a través de la membrana plasmática produciendo un efecto inmunosupresor semejante a los glucocorticoides pero con menos acción tóxica.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Alicia Goldstein".A handwritten signature in cursive script, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Roldán, A.; Burton, G.; Castillo, M.B.; Damasco, M.C.; Lantos, C.P. J. Steroid Biochem. 15 : 467, 1981.
- 2.- González, M. Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas, 1985.
- 3.- Weeks, C.M.; Duax, W.L.; Wolff, M.E. J. Am. Chem. Soc. 95 : 2865, 1973.
- 4.- Raynaud, J.P.; Ojasoo, O.; Bouton, M.M.; Philibert, D. En "Drug Design". Vol 8 (Ed. E.J. Ariens), Academic Press, New York, pág. 170, 1978.
- 5.- Harmon, J.M.; Schmidt, T.J.; Thompson, E.B. J. Steroid Biochem. 14 : 273, 1981.
- 6.- Duax, W.L.; Griffin, J.F.; Weeks, C.M.; Wawrzak, Z. J. Steroid Biochem. 31 : 481, 1988.
- 7.- Munck, A.; Leung, K. En "Modern Pharmacology-Toxicology". Vol. 8 (Ed. J.E. Pasqualini), Marcel Dekker, Inc., New York, pág. 314, 1977.
- 8.- Munck, A. J. Biol. Chem. 243 : 1039, 1968.
- 9.- Zyskowski, L.; Munck, A. Fed. Proc. 34 : 329, 1975.
- 10.- Makman, M.H.; Nakagawa, S.; White, A. Recent Prog. Horm. Res. 23 : 195, 1967.
- 11.- Makman, M.H.; Dvorkin, B.; White, A. J. Biol.Chem. 243 : 1485, 1968.
- 12.- Edelman, I.S. J. Steroid Biochem. 6 : 147, 1975.
- 13.- Feldman, D.; Funder, J.W.; Edelman, I.S. Am. j. Med. 53 : 545, 1972.
- 14.- Baxter, J.D.; Harris, A.W. Transpl. Proc. 7 : 55, 1975.

- 15.- Mosher, K.M.; Young, D.A.; Munck, A. J. Biol. Chem. 246 : 654, 1971.
- 16.- Stevens, J.; Stevens, Y.W. Cancer Res. 35 : 2145, 1975.
- 17.- Munck, A. Perspect. Biol. Med. 14 : 265, 1971.
- 18.- Castillo, M.B.; González, M.D.; Burton, G.; Lantos, C.P.; Roldán, A. Experientia 39 : 617, 1983.
- 19.- Thomas, N.; Bell, P.A. Mol. Cell. Endocrinol. 22 : 71, 1981.
- 20.- Gelehrter, T.D.; Mc. Donald, R.A. Endocrinology 109 : 476, 1981.
- 21.- Duval, D.; Durant, S.; Homo-Delarche, F. Biochim. Biophys. Acta 737 : 409, 1983.
- 22.- González, M.D.; Rondinone, C.M.; Burton, G.; Lantos, C.P.; Roldán, A. Acta physiol. pharmacol. latinoam. 36 : 303, 1986.
- 23.- Connor, P. Chem. Ind.(London), pág. 378, 1981.
- 24.- Selye, H. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 46 : 116, 1946
- 25.- Atkinson, R.M.; Davis, B.; Pratt, M.A.; Sharpe, H.M.; Tomich, E.G. J. Med. Chem. 8 : 426, 1965.
- 26.- Richards, C.D.; Hesketh, T.R. Nature 256 : 179, 1975.
- 27.- Seeman, P.M. Int. Rev. Neurobiol. 9 : 145, 1966.
- 28.- Liddle, G.W. Clin. Pharmacol. Ther. 2 : 615, 1961.
- 29.- Baxter, J.D.; Rousseau, G.G. En "Monographs on Endocrinology". Vol. 12 : Glucocorticoid Hormone Action, Springer-Verlag, Berlin, pág 1, 1979.
- 30.- Phillips, H.J. En "Tissue Culture Methods and Applications" (Ed. P.F. Kruse y M.K. Patteison Jr.), Academic Press, New York, pág. 406, 1973.

- 31.- West, C.D.; Mahajan, D.K.; Chavré, V.J.; Nabors, C.J.; Tyler, F.H. J. Clin. Endocrinol. Metab. 36 : 1230, 1973.
- 32.- Murphy, B.E.P. J. Clin. Endocrinol. 27 : 973, 1967.
- 33.- Silber, R.; Bush, R.; Oslapas, R. Clin. Chem. 4 : 270, 1950.
- 34.- Hall, E.D.; Mc. Call, J.M.; Chase, R.L.; Yonkers, P.A.; Braughler, J.M. J. Pharm. Exp. Therap. 242 : 137, 1987.
- 35.- Cupps, T.R.; Edgar, L.C.; Thomas, C.A.; Fauci, A.S. J. Immunology 132 : 170, 1984.
- 36.- Wang, S.R.; Zweiman, B. Immunopharmacology 2 : 95, 1980.
- 37.- Fauci, A.S.; Dale, D.C. J. Clin. Invest. 53 : 240, 1974.
- 38.- Reul, J.M.H.M.; van den Bosch, F.R.; de Kloet, E.R. J. Endocrinology 115 : 459, 1987.
- 39.- De Wied, D. Acta Endocrinol. Supp. 67 : 75, 1962.
- 40.- Lee, H.J.; Soliman, M.R.I. Science 215 : 989, 1981.
- 41.- García Leme, J. Gen. Pharmac. 12 : 15, 1981.
- 42.- Dale, D.C.; Fauci, A.C.; Wolff, H. N. Engl. J. Med. 291 : 1154, 1974.
- 43.- Fauci, A.S. J. Immunopharmacol. 1 : 1, 1979.
- 44.- Foster, S.J.; Mc. Cormick, M.E. Agents and Actions 16 : 58, 1985.
- 45.- Schardt, M.; Normann, S.; Sorkin, E. Int. Archs. Allergy appl. Immun. 75 : 68, 1984.
- 46.- Yu, D.T.Y.; Clements, P.J.; Paulus, H.E.; Peter, J.B.; Levy, J.; Barnett, E.V. J. Clin. Invest. 53 : 565, 1974.
- 47.- Fauci, A.S.; Dale, D.C.; Balow, J.E. Ann. Intern. Med. 84 : 304, 1976.

- 48.- Winter, C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111 : 544, 1962.
- 49.- Moraes, F.R.; García Leme, J. Microvascular Res. 23 : 281, 1982.
- 50.- Tonelli, G.; Thibault, L.; Ringler, I. Endocrinology 77 : 625, 1965.
- 51.- Spain, D.M.; Molomut, N.; Haber, A. J. Lab. Clin. Med. 39 : 383, 1952.
- 52.- Hench, P.S.; Kendall, E.C.; Slocumb, C.H.; Polley, H.F. Arch. Intern. Med. 85 : 545, 1950.
- 53.- Sincholle, D.; Bertez, C.; Legrand, A.; Conduzorgues, J.P.; Bonne, C. Drug Res. 35 : 1260, 1985.
- 54.- Popper, T.L.; Gentles, M.J.; Kung, T.T.; Berkenkopf, J.; Lutsky, B.N.; Watnick, A.S.; Shapiro, E.L. J. steroid Biochem. 27 : 4, 1987.
- 55.- Cox, J.H.; Ford, W.L. Cell Immunol. 66 : 407, 1982.
- 56.- Thomson, S.P.; Mc. Mahon, L.J.; Nugent, C.A. Clin. Immunol. Immunopathol. 17 : 506, 1980.
- 57.- Bishop, C.R.; Athens, J.W.; Boggs, D.R.; Warner, H.R.; Cartwright, G.E.; Wintrobe, M.M. J. Clin. Invest. 47 : 249, 1968.
- 58.- Tormey, D.C.; Fudenberg, H.H.; Kamin, R.M. Nature (London) 210 : 282, 1967.
- 59.- Heilman, D.H.; Gambrill, M.R.; Leichner, J.P. Clin. Exp. Immunol. 15 : 203, 1973.
- 60.- Gery, I.; Waksman, B.H. J. Exp. Med. 136 : 143, 1972.

- 61.- Oppenheim, J.J.; Stadler, B.M.; Siraganian, R.P.; Mage, M.; Mathieson, B. Federation Proc. 41 : 257, 1982.
- 62.- Gillis, S.; Ferm, M.M.; Ou, W.; Smith, K.A. J. Immunol. 120 : 2027, 1978.
- 63.- Cantrell, D.A.; Smith, K.A. Science 224 : 1312, 1984.
- 64.- Ruscetti, F.W.; Gallo, K.A. Blood 57 : 379, 1981.
- 65.- Smith, K.A.; Lachman, L.B.; Oppenheim, J.J.; Favata, M.F. J. Exp. Med. 151 : 1551, 1980.
- 66.- Snyder, D.S.; Unanue, E.R. J. Immunol. 129 : 1803, 1982.
- 67.- Gillis, S.; Crabtree, G.R.; Smith, K.A. J. Immunol. 123 : 1624, 1979.
- 68.- Boyum, A. Scand. J. Clin. Invest. 21 suppl. 97 : 31, 1968.
- 69.- Castillo, M.B. Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas, UBA, 1985.
- 70.- Nowell, P.C. Cancer Res. 21 : 1518, 1961.
- 71.- Ono, T.; Terayama, H.; Takakeu, F.; Nakao, K. Biochim. Biophys. Acta 161 : 361, 1968.
- 72.- Yu, D.T.Y. Blood 49 : 873, 1977.
- 73.- Munck, A.; Crabtree, G.R.; Smith, K.S. En "Monographs on Endocrinology Vol. 12 , Glucocorticoid Hormone Action.(Ed. J.D. Baxter y G.G. Rousseau) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pág 341, 1979.
- 74.- Nichols, N.R.; Khalid, B.A.K.; Fuller, P.J.; Rayson, B.M.; Funder, J.W. Molec. Cell. Endocr. 37 : 197, 1984.
- 75.- Lan, N.C.; Karin, M.; Nguyen, T.; Weisz, A.; Birnbaum, M.J.; Eberhardt, N.L.; Baxter, J.D. J. steroid Biochem. 20 : 77, 1984.

- 76.- Stosic-Grujicic, S.; Simic, M.M. Cell Immunol. 69 : 235, 1982.
- 77.- Lomnitzer, R.; Phillips, R.; Rabson, A.R. Clin. Immunol. Immunopathol. 27 : 378, 1983.
- 78.- Lee, S.W.; Tsou, A.P.; Chan, H.; Thomas, J.; Petrie, K.; Eugui, E.M.; Allison, A.C. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85 : 1204, 1988.
- 79.- Knudsen, P.J.; Dinarello, C.A.; Strom, T.B. J. Immunol. 139 : 4129, 1987.
- 80.- Evans, G.T. Amer. J. Physiol. 114 : 297, 1936.
- 81.- Schudt, C. Biochim. Biophys. Acta 629 : 499, 1980.
- 82.- Mills, J.N.; Thomas, S.; Williamson, K.S. J. Physiol. 151 : 312, 1960.
- 83.- Herzenberg, L.A. En "Regulatory T lymphocytes" (Ed. B.Pernis y H. Vogel), Academic Press, New York, pág. 119, 1980.
- 84.- Rivier, C.; Vale, W. Endocrinology 121 : 1320, 1987.
- 85.- Munck, A.; Guyre, P.M.; Holbrook, N.J. Endocrine Reviews 5 : 25, 1984.
- 86.- Damasco, M.C.; Díaz, F.; Ceñal, J.P.; Lantos, C.P. Acta physiol. latinoam. 29 : 305, 1979.
- 87.- Morano, M.I.; Estivariz, F. J. Endocrinol. 112 : 417, 1987.
- 88.- Sayers, G. Physiol. Rev. 30 : 241, 1950.
- 89.- Kraulis, I.; Traikov, H.; Li, M.P.; Birmingham, M.K. J. steroid Biochem. 4 : 129, 1973.
- 90.- Rogers, P.; Matossian-Rogers, A. Immunology 46 : 841, 1982.
- 91.- Fast, P.E.; Hatfield, C.A.; Fraz. C.L.; Adams, E.G.; Licht, N. J.; Merrit, M.V. Immunopharmacology 5 : 135, 1982.

- 92.- Braughler, J.M.; Chase, R.L.; Neff, G.L.; Yonkers, P.A.; Day, J.S.; Hall, E.D.; Sethy, V.H.; Lahti, R.A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244 : 423, 1988.
- 93.- Singer, S.J.; Nicholson, G.L. *Science* 175 : 720, 1972.
- 94.- Papahadjopoulos, D.; Jacobson, K.; Nir, J.; Isac, T. *Biochim. Biophys. Acta* 311 : 330, 1973.
- 95.- Shinitzky, M.; Inbar, M. *J. Mol. Biol.* 85 : 603, 1974.
- 96.- Parkson, L.; Chong, G.; Cossins, A.R. *Biochemistry* 22 : 409, 1983.
- 97.- Mély-Goubert, B.; Freedman, M.H. *Biochim. Biophys. Acta* 601 : 305, 1980.
- 98.- Kinoshita, K.J.; Kawato, S.; Ikegami, A.; Yosbede, S.; Orii, Y. *Biochim. Biophys. Acta* 647 : 7, 1981.
- 99.- Shinitzky, M.; Barenholz, Y. *J. Biol. Chem.* 249 : 2652, 1974.
- 100.-Shinitzky, M.; Inbar, M. *Biochim. Biophys. Acta* 433 : 133, 1976.
- 101.-Yeagle, P.L. *Biochim. Biophys. Acta* 822 : 267, 1985.
- 102.-Munck, A. *Biochim. Biophys. Acta* 24 : 507, 1957.
- 103.-Gershfeld, N.L.; Heftmann, E. *Experientia* 19 : 2, 1963.
- 104.-Khaiat, A.; Ketevi, P.; Ter-Minassian-Saraga, L.; Citanova, N.; Jayle, M.F. *Biochim. Biophys. Acta* 401 : 1, 1975.
- 105.-Keating, K.M.; Roess, D.A.; Peacock, J.S.; Barisas, B.G. *Biochim. Biophys. Acta* 846 : 305, 1985.
- 106.-Boullier, J.A.; Melnykovich, G.; Barisas, B.G. *Biochim. Biophys. Acta* 692 : 278, 1982.
- 107.-Johnston, D.; Matthews, E.R.; Melnykovich, G. *Endocrinology* 107 : 1482, 1980.

- 108.-Nelson, D.H. *Endocrine Reviews* 1 : 180, 1980.
- 109.-Unanue, E.R.; Kainovsky, M.J.; Engers, H.D. *J. Exp. Med.* 137 : 675, 1973.
- 110.-Almers, W.; Stirling, C. J. *Membrane Biol.* 77 : 169, 1984.
- 111.-Petris, J. J. *Cell. Biol.* 65 : 123, 1975.
- 112.-Sharon, N.; Lis, H. *Science* 177 : 949, 1972.
- 113.-Nessehs, N.K.; Spooner, B.S.; Ash, J.F.; Bradley, M.O.; Luduena, M.A.; Taylor, E.L.; Wrenn, J.T.; Yamada, K.M. *Science* 171 : 135, 1971.
- 114.-Mishra, R.K.; Passow, H.J. *Mem. Biol.* 1 : 214, 1969.
- 115.-Ashman, R.F.; Karlan, B.R.Y. *Immunopharmacology* 3 : 41, 1981.
- 116.-Wira, C.; Munck, A. *J. Biol. Chem.* 249 : 5328, 1974.
- 117.-Naray, A.; Arányi, P.; Quiroga, V. *J. steroid Biochem.* 13 : 415, 1980.
- 118.-Rousseau, G.G.; Baxter, J.D. En "Monographs on Endocrinology" Vol 12 (Ed. Baxter, J.D.; Rousseau, G.G.), Academic Press, Springer Verlag, N.Y., pág. 49, 1979.
- 119.-Braughler, J.M. *J. Neurochem.* 44 : 1282, 1985.
- 120.-Hall, E.D. *J. Neurosurg.* 68 : 462, 1988.
- 121.-Crabtree, G.R.; Smith, K.S.; Munck, A. *Cancer Res.* 38 : 4268, 1968.
- 122.-Mercier, L.; Thompson, E.B.; Simons, S.S. *Endocrinology* 112 : 601, 1983.
- 123.-Sibley, C.H.; Tomkins, G.M. *Cell* 2 : 221, 1974.
- 124.-Roldán, A.; Castillo, M.B. *Horm. Metabol. Res.* 16 : 17, 1984.
- 125.-Dayer, J.M.; Goldring, S.R.; Robinson, D.R.; Krane, S.M. *Biochim. Biophys. Acta* 586 : 87, 1979.

- 126.-Chang, J.; Gilman, S.C.; Lewis, A.J. *J. Immunol.* 136 : 1283, 1986.
- 127.-Subramanian, N.; Bray, M.A. *J. Immunol.* 138 : 271, 1987.
- 128.-Gametchu, B. *Science* 236 : 456, 1987.

