

## Tesis de Posgrado

# Regulación del sistema de interleuquina-1 por las hormonas del eje hipotálamo-pituitario-adrenal

Páez Pereda, Marcelo

1995

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Páez Pereda, Marcelo. (1995). Regulación del sistema de interleuquina-1 por las hormonas del eje hipotálamo-pituitario-adrenal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2792\\_PaezPereda.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2792_PaezPereda.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Páez Pereda, Marcelo. "Regulación del sistema de interleuquina-1 por las hormonas del eje hipotálamo-pituitario-adrenal". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2792\\_PaezPereda.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2792_PaezPereda.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**REGULACION DEL SISTEMA DE INTERLEUQUINA-1  
POR LAS HORMONAS DEL EJE HIPOTALAMO-PITUITARIO-ADRENAL**

**Marcelo Páez Pereda**

**Director: Dr. Eduardo Arzt**

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires**

**Buenos Aires 1995**

52

A mis padres

A la memoria de Mario Enrique Benavídez

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Eduardo Arzt por su constante dedicación y orientación durante el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeras de laboratorio: Mónica Costas por sus enseñanzas y consejos, Carolina Perez Castro y Rosana Peñalva por su colaboración y apoyo en los experimentos, a Marcia Puebla por su asistencia en la preparación de las figuras.

A los doctores Samuel Finkielman y Víctor Nahmod por brindarme el marco en el cual realicé este trabajo y por su excelente disposición para la discusión de ideas.

<b>A. ANTECEDENTES</b> .....	1
1. INTRODUCCION.....	1
2. INTERLEUQUINAS.....	3
2.1. INTERLEUQUINA 1.....	5
2.2. ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE IL-1.....	10
2.3. RECEPTORES DE IL-1.....	15
3. TRANSDUCCION DE SEÑALES.....	17
4. ACTIVIDAD REGULATORIA DE HORMONAS, NEUROTRANSMISORES Y NEUROPEPTIDOS SOBRE EL SISTEMA INMUNE.....	20
4.1. HORMONAS DEL EJE HPA.....	20
4.1.1. CRH Y SISTEMA INMUNE.....	25
4.1.2. ACTH Y SISTEMA INMUNE.....	28
4.1.3. GLUCOCORTICOIDES Y SISTEMA INMUNE.....	30
5. EFECTOS DE LAS CITOQUINAS SOBRE EL SISTEMA NEUROENDOCRINO.....	37
6. EXPRESION DE INTERLEUQUINAS Y SUS RECEPTORES EN EL SISTEMA NEUROENDOCRINO.....	41
7. CIRCUITO DE FEEDBACK INMUNE-HPA.....	43
<b>B. OBJETIVOS</b> .....	46
1. OBJETIVOS GENERALES.....	46
2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	46
<b>C. MATERIALES Y METODOS</b> .....	48
1. CULTIVO DE MONOCITOS HUMANOS PERIFERICOS.....	48
2. ANALISIS DE RNA.....	52
2.1. EXTRACCION DE RNA.....	52
2.2. CUANTIFICACION DE RNA.....	53
2.3. ELECTROFORESIS DE RNA CON GLIOXAL.....	53
2.4. NORTHERN BLOT.....	54

3. PREPARACION DE SONDAS.....	54
3.1. TRANSFORMACION DE BACTERIAS.....	54
3.2. AISLAMIENTO DE PLASMIDOS Y CHEQUEO POR RESTRICCION.....	56
3.3. ANALISIS DEL PATRON DE RESTRICCION DE LOS PLASMIDOS.....	56
3.4. AMPLIFICACION DE FRAGMENTOS POR PCR.....	57
3.5. AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA.....	58
4. MARCACION DE SONDAS.....	59
4.1. RANDOM PRIMER EXTENSION.....	59
4.2. TRANSCRIPCION <i>IN VITRO</i> .....	60
5. HIBRIDIZACION.....	60
6. DENSITOMETRIA.....	61
7. MEDICION DE LAS PROTEINAS IL-1 $\beta$ E IL-1ra.....	62
8. ESTADISTICA.....	62
<b>D. RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
1. CRH.....	63
1.1. EFECTOS DE CRH SOBRE LA EXPRESION DE IL-1ra.....	63
1.2. EFECTOS DE CRH SOBRE LA EXPRESION DE IL-1 $\beta$ .....	63
1.3. EFECTOS DE CRH SOBRE LA PRODUCCION DE LA PROTEINA IL-1ra.....	66
1.4. EFECTOS DEL BLOQUEO DE CRH CON EL ANTAGONISTA $\alpha$ -helical CRH.....	68
1.5. EFECTOS DE CRH SOBRE LA PRODUCCION DE LA PROTEINA IL-1 $\beta$ .....	68
1.6. EFECTOS DE LA VARIACION INTRACELULAR DE cAMP SOBRE LA EXPRESION DE IL-1ra.....	71
1.7. EFECTOS DE LA VARIACION INTRACELULAR DE cAMP SOBRE LA EXPRESION DE IL-1 $\beta$ .....	71

2. ACTH.....	75
2.1. EFECTOS DE ACTH SOBRE LA PRODUCCION DE LA PROTEINA IL-1ra.....	75
2.2. EFECTOS DE ACTH SOBRE LA EXPRESION DE IL-1ra.....	76
2.3. EFECTOS DE ACTH SOBRE LA EXPRESION DE IL-1 $\beta$ .....	77
3. GLUCOCORTICOIDES.....	80
3.1. EFECTOS DE IL-1 Y GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA PRODUCCION DE IL-1ra.....	80
3.2. EFECTOS DE IL-1 Y GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA EXPRESION DE IL-1ra.....	80
3.3. PARTICIPACION DE LA IL-1 EN LA PRODUCCION DE LA PROTEINA IL-1ra INDUCIDA POR LPS Y EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES.....	84
3.4. PARTICIPACION DE LA IL-1 EN LA EXPRESION DE IL-1ra INDUCIDO POR LPS Y EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES.....	86
3.5. EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA INDUCCION AUTOREGULATORIA DE IL-1.....	88
3.6. CINETICA DE LOS EFECTOS DE GLUCOCORTICOIDES SOBRE EL SISTEMA DE IL-1...92	92
3.7. EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA EXPRESION DEL RECEPTOR DE IL-1 TIPO II.....	95
E. DISCUSION.....	98
F. CONCLUSIONES.....	110
G. BIBLIOGRAFIA.....	112

## ABREVIATURAS

ACTH	adrenocorticotrofina
ADN	ácido desoxiribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
AVP	arginina-vasopresina
bFGF	factor de crecimiento fibroblástico básico
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
CD	cluster de diferenciación
cpm	cuentas por minuto
Con A	concanavalina A
CRH	hormona liberadora de corticotrofina
CTP	citocina trifosfato
DAG	diacilglicerol
ELAM	molécula de adhesión endotelial leucocitaria
ELISA	inmunoanálisis ligado a enzima
ES	error estándar
G-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	factor estimulante de colonias de macrófagos y de granulocitos
GRE	elemento respondedor a glucocorticoides
GTP	guanosina trifosfato
HPA	hipotalámico-pituitario-adrenal
ICAM	molécula de adhesión intercelular
ICE	enzima convertidora de IL-1
icv	intracerebro-ventricular
IFN	interferón
Ig	inmunoglobulina
IL	interleuquina
IL-1ra	antagonista del receptor de IL-1
Kb	kilobases
$k_d$	constante de disociación
LEW/N	cepa de ratas Lewis
LPS	lipopolisacárido bacteriano (endotoxina)
M-CSF	factor estimulante de colonias de macrófagos
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
mRNA	RNA mensajero
NA	noradrenalina
NK	"natural killer"
NTP	nucleótidos trifosfatos
OS	cepa de gallinas obesas
p	nivel de significación

PBS	buffer salino fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PHA	Phytohemaglutinina
PKA	proteinkinasa A
PKC	proteinkinasa C
PMA	forbol miristato acetato
POMC	proopiomelanocortina
R	receptor
REM	rapid eye movement
RIA	radioinmunoanálisis
rpm	revoluciones por minuto
SCW	pared celular de estreptococos
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TNF	factor de necrosis tumoral
TTP	timosina trifosfato

## **A. ANTECEDENTES**

### **1. INTRODUCCION**

El conocimiento del funcionamiento del sistema inmune ha evolucionado enormemente desde la caracterización de las estructuras involucradas como anticuerpos y receptores, las células que participan en la respuesta inmune, las bases moleculares de la diferenciación y amplificación celular frente a la activación por un antígeno y los mecanismos de los programas de autorregulación del sistema inmune. Sin embargo, no se conocen con igual detalle los mecanismos de interacción entre el sistema inmune y otros. Existe una estrecha relación entre el sistema nervioso y el sistema inmune. Ambos interaccionan entre sí a través de vías nerviosas y factores humorales que constituyen circuitos bidireccionales de regulación (Arzt, E. et al. 1988; Labeur, M. et al. 1991; Arzt, E. et al. 1991). El alto grado de complejidad del sistema nervioso central y del sistema inmune, sugiere que la interacción entre los mismos involucra diferentes tipos celulares y estructuras capaces de recibir y emitir señales. La gran variedad de neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas producidos por el sistema nervioso y las glándulas endócrinas, pueden actuar sobre las células inmunes, y éstas, a su vez, enviar mensajes de retroalimentación al sistema neuroendócrino. El sistema nervioso regula al sistema inmune tanto a través de la inervación de los órganos linfáticos como a través de hormonas, principalmente del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). A su vez, es retroalimentado por feed-back a través de vías nerviosas aferentes y por diversas citoquinas que actúan sobre el sistema neuroendocrino (Besedovsky, H.A. et al. 1986; Bateman, A. et al. 1989; Hermus, A. et al. 1990). Por otra parte, los sistemas nervioso, endócrino e inmune comparten el mismo tipo de señales de comunicación, tanto el sistema nervioso como el endócrino producen intrínsecamente señales propias del sistema inmune como

por ejemplo las citoquinas y las células del sistema inmune producen a su vez hormonas y neuropéptidos.

Los modelos empleados para la definición de la regulación inmunoneuroendócrina abarcan fundamentalmente estudios con células aisladas *in vitro*, estudios experimentales en animales y estudios clínicos en humanos. Los estudios *in vitro* son utilizados para explorar los efectos directos de hormonas y neurotransmisores sobre células aisladas, verificando cambios en los parámetros inmunes cuando se adicionan a los cultivos celulares los factores en estudio. Estos experimentos además de permitir observar efectos directos de los moduladores sobre poblaciones celulares definidas, hacen posible el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la elaboración de las respuestas correspondientes.

Los estudios en animales demuestran las modificaciones sobre las funciones del sistema inmune producidas tanto por la alteración directa (eléctrica, quirúrgica ó farmacológica) de diversas áreas del encéfalo y en particular del sistema neuroendócrino, como también por el efecto *in vivo* de ciertas hormonas, neuropéptidos o neurotransmisores administrados por diversas vías. También existen numerosos experimentos que demuestran el efecto del estrés y factores sociales en la respuesta inmune de animales. Más recientemente se ha incorporado el estudio de cepas de animales con mutaciones que afectan el funcionamiento de los sistemas neuroendócrino e inmune y la creación de animales transgénicos como modelos de patologías asociadas a estos sistemas.

Los estudios clínicos en humanos vinculan los efectos de factores psicosociales con la susceptibilidad a enfermedades y permiten el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Recientemente las investigaciones en esta área comienzan a delinear los efectos de diversas patologías clínicas y factores de stress sobre ciertos parámetros de activación y función del sistema inmune.

Uno de los factores clave en los circuitos de feedback inmunoneuroendócrinos es la interleuquina 1 (IL-1). La familia de IL-1 expresada por los monocitos está constituida por IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) y los receptores de IL-1 tipo I y II (Arend, W.P. 1991). Este sistema se activa durante infecciones bacterianas y regula la actividad de los ejes neuroendócrinos. Nuestro objetivo se centra en la interacción entre el sistema de IL-1 y el eje HPA.

El presente trabajo de tesis consiste en estudios sobre los efectos de las hormonas del eje HPA, factor liberador de corticotrofina (CRH), adrenocorticotrofina (ACTH) y glucocorticoides sobre la expresión del sistema de IL-1 en monocitos humanos. El interés principal es definir las bases moleculares y celulares que permitan comprender la respuesta del sistema de IL-1 de los monocitos frente a la activación del eje HPA durante una infección bacteriana. La presente introducción se centrará en los antecedentes acerca del sistema de IL-1, las hormonas del eje HPA y su interacción funcional.

## 2. INTERLEUQUINAS

Las interleuquinas son factores proteicos solubles. Inicialmente fueron encontradas en el sistema inmune actuando como factores de crecimiento y diferenciación, por ejemplo, la IL-2 para las células T o la IL-4 para las B. Además de sus funciones tróficas y de diferenciación, también regulan la actividad de las células inmunes (Tabla 1). Por ejemplo, la interacción entre los linfocitos B, T y los macrófagos, que ocupa un rol esencial dentro de la respuesta inmune, se efectúa mediante interleuquinas. Además de las interleuquinas secretadas por los linfocitos se caracterizaron otras proteínas sintetizadas por diversos tipos celulares y con funciones similares. Esto dió origen a la denominación de citoquinas para definir a los mediadores celulares solubles con funciones fundamentalmente inmunes aunque también tienen otras. Interleuquinas es el

término adoptado para definir a las citoquinas que coordinan la comunicación entre los diversos tipos de leucocitos. Se dividen en linfoquinas o monoquinas según sean sintetizadas por linfocitos o monocitos, respectivamente.

Las citoquinas secretadas luego de la activación de las células inmunes, actúan sobre el mismo u otros tipos celulares independientemente de la especificidad del antígeno que desencadenó la respuesta. Por ejemplo, algunos de estos factores presentan actividad quimiotáctica para neutrófilos y macrófagos y pueden también activar a dichas células para producir otros mediadores. De este modo, un estímulo antigénico inicial, puede amplificar la reacción y reclutar a diversos tipos celulares para producir la respuesta correspondiente. Como esta tesis trata de la regulación de la expresión de la IL-1 y su familia, la presente introducción se centrará en estas interleuquinas.

**Tabla 1.** Propiedades biológicas de las citoquinas (Burke, F. et al. 1993).

Interleuquinas	Acciones
IL-1 $\alpha$ y $\beta$	inducción de las proteínas de la fase aguda, inducción de hipotensión y fiebre, estimulación de la hematopoiesis <i>in vivo</i> , activación de células T, estimulación de la proliferación y de la diferenciación de células T, estimulación de la proliferación y de la diferenciación de células B, estimulación de la actividad de granulocitos, eosinófilos y células NK, regulación de moléculas de adhesión y quimiotaxis, regulación de funciones de células endoteliales, regulación de actividad osteoclástica.
IL-2	activación de células T, estimulación de la proliferación y de la diferenciación de células T, estimulación de la proliferación y de la diferenciación de células B, estimulación de la actividad de células NK, regulación de moléculas de adhesión y quimiotaxis, actividad antitumoral <i>in vivo</i> .
IL-3	estimulación de la hematopoiesis <i>in vivo</i> , estimulación de la diferenciación y proliferación de las células B, estimulación de la actividad de los eosinófilos y células NK, regulación de moléculas de adhesión y quimiotaxis.

Interleuquinas	Acciones
IL-4	activación de células B, estimulación de la proliferación y de la diferenciación de células B, activación de macrófagos, activación de células T, estimulación de la proliferación y diferenciación de células T, estimulación de la actividad de los eosinófilos y células NK, selección de isotipos (IgE, IgG), estimulación de la hematopoesis, regulación de moléculas de adhesión y quimiotaxis.
IL-5	activación de células B, estimulación de la actividad de los eosinófilos, selección de isotipos (IgA), regulación de moléculas de adhesión y quimiotaxis.
IL-6	inducción de las proteínas de la fase aguda, estimulación de la hematopoesis, activación de células T, estimulación de la proliferación y de la diferenciación de células T, estimulación de la diferenciación de células B, estimulación de la actividad de las células NK, regulación de moléculas de adhesión y quimiotaxis, regulación de actividad osteoclástica.
IL-7	activación de células T, estimulación de la proliferación y de la diferenciación de células T, estimulación de la proliferación y de la diferenciación de células B, estimulación de la actividad de las células NK.
IL-8	activación de células T, regulación de moléculas de adhesión y quimiotaxis.
IL-9	estimulación de la proliferación de células T.
IL-10	estimulación de la proliferación de células T, estimulación de la proliferación y de la diferenciación de células B.
IL-11	inducción de las proteínas de la fase aguda, estimulación de la hematopoesis.
IL-12	estimulación de la actividad de las células NK, estimulación de la proliferación de células T, selección de isotipos (IgE).

## 2.1 INTERLEUQUINA 1

La IL-1 fue inicialmente caracterizada como un pirógeno endógeno, capaz de inducir fiebre cuando es administrada en animales (Atkins, E. 1989). Su función

como regulador inmunológico fue sugerida por su actividad como factor activador de timocitos. Como producto de los macrófagos, la IL-1 juega un rol importante en la activación de los linfocitos T. Una vez que el receptor T reconoce al antígeno en el contexto MHCII (complejo mayor de histocompatibilidad de clase II), se produce un sinergismo con las citoquinas derivadas de los macrófagos, IL-1 e IL-6, las cuales facilitan a las células CD4<sup>+</sup> a activarse. Como resultado se induce la producción de la IL-2 y la expresión del receptor de IL-2 (IL-2R) por dichos linfocitos T (Smith, K. 1988). Sin embargo, a diferencia de otras interleuquinas que como la IL-2 tienen funciones principalmente tróficas, la IL-1 es considerada una citoquina con funciones fundamentalmente inflamatorias (Dinarello, C.A., 1991). Muchos de los efectos producidos por IL-1 son mediados por IL-6. La IL-1, el TNF- $\alpha$  y la IL-6 por sus efectos comunes y similares patrones de producción constituyen el conjunto de citoquinas inflamatorias (Dinarello, C.A. 1994).

Existen dos tipos de IL-1: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Ambas moléculas reconocen y se unen al mismo receptor de superficie celular. Son codificadas por dos genes distintos que comparten secuencias homólogas en un 26 % y están localizados en el cromosoma 2 (Nicklin, M.J. et al. 1994). Las estructuras tridimensionales de ambas proteínas han sido analizadas encontrándose similitudes y conservación en los sitios de unión a los receptores correspondientes (Preistle, J.P. et al. 1988, 1989). Los monocitos sintetizan ambas formas pero la IL-1 $\beta$  es 50 veces más abundante (Ohmori, Y. et al. 1990). Por otra parte, la IL-1 $\beta$  es eficientemente secretada por los monocitos y entra en circulación mientras que la IL-1 $\alpha$  permanece asociada a la membrana. Existen evidencias de que la IL-1 $\alpha$  podría actuar como un mensajero autócrino (Dinarello, C.A. 1991). También tienen sitios de glicosilación pero estos no parecen ser esenciales para su función biológica ya que las formas recombinantes no glicosiladas tienen 100 % de actividad (Casagli, M.C. et al. 1989). La IL-1 $\alpha$  y  $\beta$  comparten sus acciones biológicas y ambas se

unen a los mismos receptores (Naito, Y. et al.1989, Rivier, C. et al. 1989), por lo tanto nos referiremos a ambas indistintamente como IL-1.

La IL-1 se sintetiza como un precursor de alto peso molecular que luego es clivado por una cisteína proteasa específica llamada enzima de conversión de IL-1 (ICE). Sin embargo la IL-1 no posee la secuencia característica de las proteínas secretadas llamada péptido señal que las dirige e inserta en el sistema de Golgi. Se desconoce el mecanismo de transporte hasta la membrana plasmática pero podría incluir exocitosis de vesículas, proteínas transportadoras o escape por muerte celular (Dinarelo, C.A. 1991).

La expresión de IL-1 está regulada a distintos niveles: transcripcional, estabilidad del mRNA, procesamiento enzimático del precursor y secreción (Lee,S. et al. 1988, Walev, C. et al. 1995). En condiciones basales los monocitos de individuos sanos no expresan IL-1. La expresión de IL-1 es fuertemente estimulada por endotoxinas bacterianas que son lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular de bacterias Gram negativas. El pico de transcripción de IL-1 estimulada por endotoxinas se observa a la tres horas aunque la respuesta es muy rápida y ya se registra a los 15 min (Schindler, R. et al. 1990). Cuando el estímulo para la síntesis de IL-1 es LPS, el RNA mensajero es eficientemente traducido (Dinarelo, C.A., 1994).

La IL-1 es una citoquina con propiedades pleiotrópicas, responsable de mediar una variedad de procesos metabólicos, endócrinos o inmunes involucrados en la defensa del organismo, fenómenos de inflamación y respuesta a daños tisulares. Inicialmente fue descrita como un producto derivado de células macrofágicas pero también se ha detectado fuera del sistema inmune, en una variedad de tipos celulares, por ejemplo, en fibroblastos, queratinocitos de la piel, astrocitos cerebrales, células de la microglía y de la hipófisis (Koenig, J.I. et al. 1990). Es producida en respuesta a infecciones, toxinas, productos de linfocitos activados,

complemento y factores de coagulación de la sangre (Dinarello, C.A. 1991). Pueden distinguirse los efectos locales de IL-1 de los efectos producidos por los aumentos en los niveles plasmáticos sistémicos. Algunos ejemplos son:

- A nivel sistémico la IL-1 es capaz de inducir hipotensión, somnolencia, mialgias, artralgias, anorexia, estado de shock y fiebre. Todos estos síntomas se asocian usualmente a eventos tóxicos. Sin embargo, no se detectan niveles de IL-1 tan elevados como los de otras citoquinas (TNF- $\alpha$  o IL-6) asociados al shock séptico (Smith, J.W. et al. 1992, Dinarello, C.A. 1994).
- Tiene efectos catabólicos asociados a la proteólisis muscular que produce un balance de nitrógeno negativo. Produce hipoglucemia al elevar los niveles de insulina (Moldawer, L.L. et al. 1988).
- A nivel del sistema nervioso central induce fiebre y sueño de onda lenta y disminuye el sueño REM (rapid eye movement, Tewari, A. et al. 1990).
- A nivel local induce la migración de neutrófilos y macrófagos a través de la producción de IL-8 (Kaplansky, G. et al. 1993).
- En el hígado induce la producción de fibrinógeno, complemento, metalotioneínas, y factores de coagulación (Dinarello, C.A. 1994).
- Al aumentar la expresión de las moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales, la IL-1 aumenta la adhesión de neutrófilos, monocitos y de linfocitos en los sitios de inflamación (Dejana, E. et al. 1989).
- Induce la producción de prostaglandina E2, colagenasa, y de fosfolipasa A1 que median el proceso inflamatorio (Dejana, E. et al. 1989).

- Participa en la hematopoyesis mediante la estimulación de la producción de factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) e IL-3 (Bagby, G.C. et al. 1989, Fibbe, W.E. et al. 1989).
- La IL-1 coopera con otras citoquinas, como la IL-4, en la activación de las células B, tanto para fenómenos de proliferación, como para la secreción de inmunoglobulinas (Dinarello, C.A. 1991).
- Participa en la regresión de cartílagos y huesos (Koenig, A. et al. 1988).
- Está asociada a ciertas enfermedades autoinmunes, por ejemplo, se encuentra en altas concentraciones en el fluido sinovial de las articulaciones que presentan artritis (Dinarello, C.A. 1991).

Entre los efectos endócrinos se destaca la activación de la producción de CRH, ACTH y glucocorticoides. También induce endorfinas, vasopresina y somatostatina pero inhibe la liberación de prolactina (Besedovsky, H. et al. 1992). Estos efectos de IL-1 son mediados por receptores localizados en las células productoras de estas hormonas. Sin embargo son menos claras las vías de acción de la IL-1 a nivel del sistema nervioso central. Dado su peso molecular, la IL-1 no podría atravesar la barrera hematoencefálica por difusión simple. Se ha planteado que la IL-1 podría ingresar al sistema nervioso central a través de órganos en los cuales la barrera es más permeable como el organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) o los órganos circumventriculares (Dinarello, C.A. 1994). Alternativamente se planteó la posible existencia de transportadores específicos para la IL-1 que facilitarían su entrada al sistema nervioso central (Banks, W.A. et al. 1990). De todas formas, dado que la IL-1 es capaz de inducir su propia síntesis en un feedback positivo, el pasaje de bajas cantidades de IL-1 al sistema nervioso

central bastaría para desencadenar su síntesis por parte de células de la glía y de esta forma amplificar la señal.

## 2.2 ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE IL-1

En sobrenadantes de cultivo de monocitos estimulados se describió la presencia de actividad inhibitoria de los efectos de IL-1 (Arend, W.P. et al. 1985). Después se describieron actividades similares en fluidos de diversa procedencia (Larric, J.W. et al. 1989). A partir de estos fluidos, fue purificado un factor llamado antagonista del receptor de IL-1, IL-1ra. Una vez purificada la proteína, fue clonado el cDNA correspondiente (Eisenberg, S.P. et al. 1990). Simultáneamente fue clonado el gen correspondiente a la proteína previamente llamada IRAP (Interleukin-1 receptor antagonist protein) y se comprobó que se trataba del mismo IL-1ra (Carter, D.B. et al. 1990). La molécula clonada presentó una secuencia estructuralmente relacionada con la IL-1 pero con propiedades exclusivamente inhibitorias (Eisenberg, S.P. et al. 1990). El IL-1ra producido por monocitos tiene 152 aminoácidos con un 41 % de homología con IL-1 $\beta$  y presenta varias formas de peso molecular entre 18 y 25 KD. Estas variantes constituyen distintos grados de glicosilación del mismo péptido. Sin embargo la glicosilación no es indispensable para conservar la actividad biológica y el IL-1ra recombinante producido en bacterias es activo (Arend, W.P., 1991).

Esta nueva citoquina antagoniza la unión de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  a los receptores de IL-1 (Arend, W.P. 1991, Granowitz, E.V. et al. 1992, Gousse, G.C. et al. 1994). A pesar de algunas discrepancias en la literatura, se acepta que el IL-1ra se une con similar afinidad a ambos tipos de receptores de IL-1 y antagoniza por igual la unión de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Granowitz, E.V., et al. 1991, Granowitz, E.V., et al. 1992, Arend, W.P. et al. 1991). Para inhibir los efectos de IL-1 se necesitan entre 100 y 1000 veces de exceso en la concentración molar de IL-1ra. Este hecho sugiere

que es suficiente la ocupación de un reducido número de receptores de IL-1 por su agonista para producir una respuesta apreciable (Arend, W.P. 1991).

Se ha reportado una única posible acción agonista de IL-1ra pero ésta se debe probablemente a contaminantes en la preparación de proteína usada (Mitchell, M.D., et al. 1993). El IL-1ra constituye la primera molécula producida naturalmente por el organismo que funciona solamente como un antagonista del receptor (Arend, W.P. 1991).

La exclusiva propiedad antagonista del IL-1ra posibilitó determinar la participación o no de IL-1 en diversos procesos patológicos tanto *in vitro* como *in vivo*. También se han asociado alteraciones en la producción de IL-1ra con algunas patologías, en los cuales el balance del sistema de IL-1/IL-1ra se encuentra alterado, por ejemplo:

- artritis reumatoidea (Firestein, G.S., et al. 1992, Chikanza, I.C., et al. 1994, Arend, W.P. 1993).
- síntomas de shock séptico (Fisher, E. et al. 1992),
- enfermedad intestinal inflamatoria (Casini-Raggi, V., et al. 1995),
- leucemia mieloide crónica y aguda (Yin, M. et al. 1992).
- diabetes mellitus (Mandrup-Poulsen, T. et al. 1993).
- colitis (Cominelli, F. et al. 1992).
- proliferación de sarcomas de Kaposi (Louie, S. et al. 1995).
- desarrollo de carcinoma broncogénico (Smith, D.R. et al. 1993).
- psoriasis (Hammberg, C. et al. 1992).
- enfermedad de Hodgkin (Gruss, H.J. et al. 1992).
- desarrollo de granulomas en la esquistosomiasis (Chensue, S.W. et al. 1993).
- alergia y anafilaxis intestinal (Theodorou, V. et al. 1993).

IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1ra comparten secuencias homólogas y sus genes tienen una distribución similar de exones e intrones (Nicklin, M.J. et al. 1994). Además tienen

secuencias regulatorias consenso comunes como las que unen a los factores de transcripción AP-1 y NF $\kappa$ B (Smith, M.F. et al. 1992). Los tres genes fueron localizados en el cromosoma 2, son vecinos entre sí y sus secuencias se encuentran conservadas entre distintas especies lo cual hace pensar en un origen evolutivo común para esta familia de genes (Eisenberg, S.P. et al. 1991). Todas estas evidencias sugieren que los tres genes evolucionaron por duplicación a partir de un gen ancestral común y luego diversificaron sus funciones.

En monocitos humanos estimulados con LPS se detectó que todas las células que expresan IL-1ra también sintetizan IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$  (Andersson, J. et al. 1992). Sin embargo, la cinética de expresión es diferente para estos genes, lo cual sugiere que hay mecanismos de regulación distintos. Por otra parte, existe una mayor proporción de células productoras de IL-1  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  comparada con la proporción de células productoras de IL-1ra (Andersson, J. et al. 1992), lo cual define distintas poblaciones de monocitos. Dado que un mismo monocito puede producir dos moléculas antagónicas, IL-1 e IL-1ra, la regulación de su producción constituye un modelo único para el estudio de los mecanismos de regulación génica.

Existen distintos tipos de regulación del sistema de IL-1. Monocitos estimulados con LPS producen IL-1 e IL-1ra en cantidades equivalentes (Poutsika, D. et al, 1991, Arend, W.P. et al, 1991), es decir que ambos genes son regulados en la misma dirección. Los efectos de los glucocorticoides, como se detalla en la correspondiente sección, también son inhibitorios en ambos genes (Arzt, E. et al. 1994). Sin embargo, hay factores que regulan diferencialmente este sistema: TGF- $\beta$ 1, IL-4 y el cross-linking del receptor Fc $\gamma$  inhiben IL-1 y estimulan IL-1ra (Turner, M. et al. 1991, Fenton, M.J. et al. 1992, Wong, H.L., et al. 1993, Wahl, S.M. et al. 1993, Galve de Rochemonteix, B. et al. 1993, Chomarat, P. et al. 1995, Marsh, C.B. et al. 1994). Por otra parte, otros factores como IgG , suero humano o GM-CSF estimulan IL-1ra pero no tienen efectos sobre IL-1 (Poutsika, D.D. et al.

1991, Arend, W.P. et al. 1991). El interferón- $\alpha$  regula de diferente manera la expresión de IL-1 e IL-1ra según sea agregado antes o después de la activación de linfocitos con LPS (Huang, Y. et al. 1995). A pesar de tratarse de moléculas antagónicas, estos ejemplos demuestran que son reguladas en forma similar o recíproca por varios factores. Probablemente estos genes comparten algunos pero no todos los factores que regulan su expresión como secuencias regulatorias en sus promotores y los factores proteicos correspondientes que actuarían en trans.

Polimorfismos de secuencias repetitivas han sido propuestos como las causas de la diferente regulación de IL-1 o IL-1ra en condiciones normales o en patologías asociadas a este sistema. Se han encontrado varios tipos de polimorfismo en el cluster de genes de la familia de IL-1. En particular, un alelo poco común de esta región localizada en el intrón del gen de IL-1ra está asociada a una sobreproducción de IL-1ra en sujetos normales (Danis, V.A. et al. 1995).

La familia de IL-1 está asociada a diversas patologías de origen inflamatorio o que presentan niveles elevados de citoquinas. Se ha demostrado que el balance entre IL-1 e IL-1ra se encuentra alterado en algunas patologías que se detallan a continuación.

Muchos microorganismos patógenos producen toxinas que ocasionan hipotensión en el organismo infectado, falta de irrigación en órganos vitales, acidosis y finalmente la muerte (Dinarello, C.A. 1992). Un caso particular y que ha recibido especial atención es el de las afecciones producidas por bacterias Gram negativas productoras de endotoxinas. El shock séptico producido por infecciones con bacterias Gram negativas es una de las principales causas de muerte en pacientes en terapia intensiva y sus síntomas no se revierten con la administración de antibióticos. En este caso se observa una sobreproducción de

citoquinas, asociadas al shock séptico (Beutler, B. et al 1985, Alexander, H.R. et al. 1991, Fisher, E. et al. 1992, Ohlson, K. et al. 1990, Wakabayashi, G. et al. 1991). El tratamiento con antibióticos resulta inefectivo, sin embargo pueden bloquearse los efectos de shock mediante el bloqueo de los efectos de citoquinas. Anticuerpos anti-TNF $\alpha$  o IL-1ra recombinante pueden reducir la mortalidad producida por shock séptico (Beutler, B. et al 1985, Ohlson, K. et al. 1990, Dinarello, C.A. 1994). Estas evidencias, sustentan la idea de que la sintomatología que acompaña al shock séptico es consecuencia directa de la sobreproducción de citoquinas inflamatorias más que de la infección bacteriana. Los mecanismos hipotensores presentes en el shock séptico podrían involucrar a mediadores producidos por la activación de ciclooxigenasa por IL-1 (Okusawa, S., et al 1988) y la producción de óxido nítrico (Beasley, D. et al. 1991) mientras que la alteración en el tráfico de leucocitos se debe a los cambios en la expresión de moléculas de adhesión debidos a IL-1 (Dejana, E. et al. 1989).

El IL-1ra , al igual que las citoquinas inflamatorias, está elevado durante la endotoxemia (Granowitz, E.V. et al. 1991, Fischer, E. et al. 1992, Arzt, E. et al. 1994). Dada la participación de las citoquinas en el shock séptico, resulta evidente y necesaria la existencia de controles de la producción y modulación de la acción biológica de la citoquinas, a través de diversos mecanismos entre los cuales se involucran los inmunoneuroendócrinos.

Afecciones que, al igual que el shock séptico, están asociadas con la producción de citoquinas como pancreatitis, rechazo de órganos transplantados o coagulación intravascular diseminada también tienen participación de IL-1 (Dinarello, C.A. 1991).

Un desbalance del sistema de IL-1 podría ser la causa de la aparición o el desarrollo de algunas patologías inflamatorias. Por ejemplo, en la artritis reumatoidea el balance entre IL-1 e IL-1ra se encuentra desplazado con respecto

a los niveles encontrados en otras patologías y revela un déficit en la producción de IL-1ra (Chikanza, I.C. et al. 1995, Arend, W.P. 1993, Firestein, G.S. et al. 1992).

También se han encontrado relaciones IL-1/IL-1ra que favorecen los efectos de IL-1 en otras patologías como por ejemplo, enfermedad intestinal inflamatoria (Casini-Raggi, V. et al. 1995), leucemia mieloide aguda (Yin, M. et al. 1992), diabetes mellitus insulino-dependiente (Mandrup-Poulsen, T. et al. 1993) y psoriasis (Hammemberg, C. et al. 1992).

En algunas enfermedades se encuentran niveles elevados de IL-1ra que bloquean los efectos inmunoestimuladores necesarios para la reacción inmune correspondiente. Por ejemplo: enfermedad de Hodgkin (Gruss, H.J. et al. 1992), carcinoma broncogénico (Smith, D.R. et al. 1993) y granulomas producidos por huevos de esquistosoma (Chensue, S.W. et al. 1993).

Sarcomas de Kaposi de pacientes con SIDA expresan IL-1 (Ensoli, B. et al. 1992). Tanto la IL-1 como la IL-6 y el bFGF actúan como factores autócrinos que estimulan la proliferación de células tumorales de Kaposi pero no tienen efectos sobre células endoteliales, fibroblásticas o musculares normales. El IL-1ra es capaz de suprimir la proliferación *in vitro* de células tumorales de Kaposi (Louie, S. et al. 1995).

### 2.3 RECEPTORES DE IL-1

Existen hasta el momento dos tipos descritos de receptores para IL-1. El primero de ellos, llamado IL-1R tipo I fue caracterizado por experimentos de unión en líneas celulares linfocitarias (Dower, S.K. et al. 1985). Posteriormente fue clonado el cDNA correspondiente (Sims, J.E. et al. 1988, Sims et al. 1994). Este tipo de receptor se expresa principalmente en células T, fibroblastos, queratinocitos,

hepatocitos y células endoteliales aunque está también presente en casi todos los tipos celulares. Su promotor es similar a los promotores encontrados en los genes vitales expresados constitutivamente (Dinarello, C.A. 1994). En experimentos de "crosslinking" con IL-1 marcada radioactivamente se observó la existencia del segundo receptor de IL-1, llamado IL-1R tipo II, el cual también fue clonado (McMahan, C.J. et al. 1991). A diferencia de los receptores de interleuquinas hematopoyéticas que comparten un dominio extracelular, los receptores de IL-1 forman parte de la familia de genes de inmunoglobulinas (Sims, J.E., et al. 1988, McMahan, C.J. et al. 1991) y tienen un 28 % de homología en su secuencia. Ambos tipos de receptores son codificados por distintos genes pero estos están ligados y se localizan sobre un mismo brazo cromosómico en distintas especies, lo cual hace pensar que se originaron a partir de un mismo gen (Yoo, J. et al 1994). Tienen un único segmento transmembrana pero el IL-1R tipo II sólo tiene un pequeño segmento citosólico mientras que el IL-1R tipo I tiene un dominio citosólico con sitios fosforilables y por lo tanto capaz de transducir señales. Se ha propuesto que el receptor de IL-1 tipo I es el único capaz de transducir señales (Sims, J.E. et al. 1993) mientras que el de tipo II actúa secuestrando la IL-1 circulante y por lo tanto tienen funciones inhibitorias (Colotta, F. et al. 1993, Re, F. et al. 1994, Colotta, F. et al. 1994). El IL-1R II es expresado fundamentalmente por monocitos, neutrófilos y células B (Spriggs, M.K. et al. 1990, McMahan, C.J. et al. 1991). Los monocitos no expresan niveles detectables de IL-1R tipo I, sin embargo algunos efectos de IL-1 sobre estas células fueron inhibidos con anticuerpos contra este tipo de receptor y no contra el otro (Sims, J.E. et al. 1993, Dinarello, C.A. 1991, Sims, J.E. et al. 1994). Se ha demostrado que un receptor quimérico que tiene la porción extracelular de tipo II y la intracelular de tipo I es capaz de transducir señales eficientemente (Heguy, A. et al. 1993). Por otra parte se ha observado que ambos tipos de receptores no pueden formar heterodímeros activados por la unión de IL-1 (Sims, J.E. et al. 1994). Se ha comprobado que

IL-1ra se une al receptor de IL-1 inhibiendo competitivamente la unión de IL-1 (Granowitz, E.V. et al. 1991).

Se han encontrado también formas solubles de los receptores de IL-1 que unen IL-1 disminuyendo su concentración en forma libre. Estos receptores solubles también son capaces de secuestrar IL-1ra. Mientras que el IL-1R tipo II soluble junto con IL-1ra es capaz de inhibir completamente los efectos de IL-1, el IL-1R tipo II soluble disminuye la actividad antagonista de IL-1ra (Burger, D. et al. 1995). Este es el primer ejemplo en el cual dos tipos de inhibidores contrarrestan mutuamente sus efectos dejando la actividad del ligando inalterada.

### 3. TRANSDUCCION DE SEÑALES

Entre las vías de segundos mensajeros involucradas en la activación de las células del sistema inmune y regulación de la expresión de genes de citoquinas, se encuentran la de proteína G y cAMP, los mediadores lipídicos como diacilglicerol (DAG) y el aumento de las prostaglandinas mediado por proteína quinasa C. En esta tesis nos centramos en los mecanismos de activación de los monocitos y las vías de transducción de señales que involucran la IL-1 y su receptor.

Como modelo de activación del monocito se utilizan *in vivo* o *in vitro*, LPS que consiste en un dominio de polisacáridos variables unidos covalentemente a un fosfolípido diglucosamina acetilado, lípido A. El LPS es un potente estimulador de la expresión de IL-1 e IL-1ra. Se une a un receptor macrofágico llamado CD14 además de a otros posibles sitios de unión menos caracterizados como el complejo CD 11/CD 18 (Cavaillon, J.M. 1994). Los mecanismos de transducción de señales del LPS en monocitos no han sido completamente aclarados pero probablemente están asociados a un aumento intracelular de  $Ca^{2+}$ , activación de

protein kinasa C y liberación de prostaglandina E2 (Hamilton, T.A. et al. 1987, Cavailon, J.M. 1994, Dinarello, C.A. 1994).

Los receptores de IL-1 pertenecen a la familia de inmunoglobulinas y no presentan los siete dominios transmembrana que poseen los receptores que transducen señales a través de proteína G y cAMP. Sin embargo, la transducción de señales de IL-1 a través de su receptor está asociada con la proteína G inhibitoria sensible a toxina Pertussis aunque otros autores encontraron una vía de transducción independiente de proteína G (Brooks, J.W. et al. 1994). La vía de cAMP involucra la interacción del receptor activado con una proteína G (Gilman, A.G. 1987). La proteína G consta de varias subunidades y existen tipos estimulatorios e inhibitorios. La subunidad  $\alpha$  de la proteína G tiene un sitio para ADP ribosilación que es susceptible de ser afectado permanentemente por la toxina Pertussis. La toxina pertussis es una ADP-ribosiltransferasa que activa la subunidad  $\alpha$  Gi y mantiene a las otras subunidades unidas a membrana inhibiendo los efectos mediados por proteína G. La subunidad  $\alpha$  a su vez interacciona con la adenilato ciclasa modulando la producción de cAMP. A su vez el cAMP activa la protein kinasa A (PKA) la cual fosforila a otras proteínas ocasionando la activación de factores de transcripción.

La IL-1 también es capaz de estimular la producción de DAG. La unión de IL-1 a su receptor puede activar mediante la activación de proteína G, la fosfolipasa C que produce diacilglicerol (DAG). Este a su vez activa la proteinkinasa C (PKC) desencadenando una cadena de fosforilaciones que lleva a la activación de factores de transcripción. La producción de DAG estimulada por IL-1 conduce al aumento del RNA mensajero de la ciclooxigenasa y por lo tanto de prostaglandina E2 (Dinarello, C.A. 1991).

En la regulación de la expresión de IL-1 también están involucradas las mismas vías de transducción de señales que se activan frente a la estimulación del monocito con IL-1. Este hecho hace posible que tengan lugar en el monocito mecanismos intrínsecos de feedback que regulen la expresión de IL-1. El cAMP actúa sobre la expresión de IL-1 inhibiendo o estimulando la síntesis de IL-1 estimulada por LPS (Hurme, M. et al. 1990, Tannenbaum C.S. et al. 1989, Willis, S.A. et al. 1995, Koh, W.S. et al. 1995). Los efectos de cAMP son generalmente inhibitorios y el aumento de los niveles intracelulares de cAMP están asociados con la supresión de la activación del monocito, sin embargo, se ha descrito la estimulación de IL-1 por cAMP en monocitos adheridos a la placa de cultivo durante tiempos prolongados o estimulados con PMA (Dinarello, C.A. 1991).

También existen otras señales que se inducen durante la activación del monocito como por ejemplo la producción de óxido nítrico. PKA y PKC activadas por IL-1 son capaces de fosforilar la enzima óxido nítrico sintetasa inducible presente en monocitos. Esta vía de transducción es particularmente importante en la activación del monocito y el desarrollo de la respuesta inflamatoria (Kanno, K. et al. 1994, Balligand, J.L. et al. 1995, Brooks, J.W. et al. 1994).

Un rol no menos importante en las vías de transducción de señales lo juegan las fosfatasa serina/treonina (Rossi, B. 1993). Estas enzimas son imprescindibles para llevar al estado inactivado a algunos factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B. Por otra parte, también pueden cumplir con funciones activadoras como en el caso de c-jun que tiene que sufrir defosforilaciones en algunos sitios para ser activado como parte del factor de transcripción AP-1 (Rossi, B. 1993). Los factores de transcripción mencionados tienen sitios de unión en los promotores de muchas interleuquinas y son activados en el proceso de activación del monocito (Brooks, J.W. et al. 1994). Ambos factores de transcripción son activados en respuesta a IL-1 (Dinarello, C.A. 1991). Además de NF- $\kappa$ B y AP-1, también NF-IL-6 está

involucrado en el proceso de activación linfocitaria, el proceso inflamatorio y la regulación de la transcripción de genes de citoquinas.

La comunicación entre células inmunes y neuroendócrinas presenta características pleiotrópicas y redundantes dado que una misma hormona o citoquina puede tener varios efectos distintos o varias citoquinas producir efectos similares. Las bases moleculares de estos fenómenos se encuentran en las vías de transducción de señales (Kishimoto, T. et al. 1994).

#### 4. ACTIVIDAD REGULATORIA DE HORMONAS, NEUROTRANSMISORES Y NEUROPEPTIDOS SOBRE EL SISTEMA INMUNE.

Existen numerosos y variados efectos de hormonas sobre parámetros inmunes. Se han descrito acciones de las hormonas hipotalámicas, hipofisarias, sexuales y metabólicas como insulina por ejemplo (Besedovsky, H. et al. 1992, Savino, W. et al. 1995, Spangelo, B.L. et al. 1995). También han sido estudiados los efectos de neurotransmisores y neuropéptidos como adrenalina, acetilcolina, óxido nítrico, sustancia P, bradiquinina, péptido intestinal vasoactivo, somatostatina y angiotensina, entre otros (Besedovsky, H. et al. 1992, Merrill, J.E. et al. 1995). En la presente introducción nos concentramos sólo en los efectos de las hormonas del eje HPA.

##### 4.1 HORMONAS DEL EJE HPA

El eje HPA es activado en diversas circunstancias y está implicado en la regulación e integración de muchos procesos fisiológicos o patológicos. Nos referiremos inicialmente, muy brevemente, a algunas de las acciones de las hormonas de este eje.

Frente a estímulos estresantes o siguiendo un ritmo circadiano se produce la activación de la producción de glucocorticoides. Estos estímulos son integrados en el sistema nervioso central y transducidos al resto del organismo a través del sistema neuroendócrino (Irving, M. 1994, Vamvakopoulos, N.C. et al. 1994). En el hipotálamo se produce la síntesis de las neurohormonas que controlan la producción de hormonas hipofisarias. La hormona hipofisaria que regula la producción de glucocorticoides en la glándula adrenal es la ACTH. Las principales hormonas hipotalámicas inductoras de la secreción de ACTH conocidas hasta el presente son: la CRH, la vasopresina y la oxitocina (Plotzky, P.M. et al. 1987, Orth, D.N. 1992, Vamvakopoulos, N.C. et al. 1994). Estas hormonas son sintetizadas y secretadas por las neuronas de los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo. Las neuronas productoras de CRH se encuentran principalmente localizadas en la división medial parvocelular del núcleo paraventricular (Charlton, B.G. et al. 1987). Parte de dichas neuronas también expresan bajos niveles de vasopresina (Orth, D.N. 1992). Aunque las neuronas secretoras de oxitocina y la mayoría de las neuronas hipotalámicas productoras de vasopresina se encuentran concentradas en el núcleo supraóptico y en la división magnocelular del núcleo paraventricular, proyectándose principalmente hacia la pituitaria posterior, diversas publicaciones sugieren que dichas neuronas podrían también controlar la respuesta de ACTH en la pituitaria anterior causada por estresores específicos (Dohanics, J.E.H.G. et al. 1991). Las hormonas hipotalámicas CRH y vasopresina liberadas en el sistema porta hipotálamo-hipofisario actúan sobre receptores específicos en las células corticotróficas de la hipófisis anterior produciendo la liberación de ACTH a la circulación (Orth, D.N. 1992). Receptores para CRH fueron detectados mediante técnicas de autoradiografía cuantitativa y de unión en membranas celulares. Se identificaron sitios de unión de alta afinidad de la CRH en sistema nervioso central y en hipófisis anterior (De Souza, E.B. et al. 1985). La distribución de los receptores de CRH es similar a la de las neuronas productoras de CRH. Fue

observada una alta densidad de sitios de unión en la neocorteza. La unión de la hormona a su receptor, tanto en ratas como en el cerebro de primates, es reversible, saturable y de alta afinidad con una Kd del orden nanomolar (De Souza, E.B. et al. 1985). Este receptor transduce su señal a través del aumento intracelular de cAMP (Audhya, T. et al. 1991, Webster, E.L. et al. 1989). Se han clonado dos tipos de receptores de CRH. El primero de ellos, CRH-R1, fue clonado a partir de un tumor corticotrófico humano y se expresa en células corticotróficas de hipófisis anterior mediando los efectos de CRH sobre la liberación de ACTH (Chen, R. et al. 1993). Este receptor también se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central (Potter, E. et al. 1994). Recientemente ha sido clonado el segundo tipo de receptor de CRH llamado CRH-R2. Este receptor se expresa principalmente en tejidos periféricos como corazón, músculo y pulmones (Stenzel, P. et al. 1995). Para estudiar las funciones de CRH también se han desarrollado animales transgénicos que sobreexpresan CRH y desarrollan síntomas de hipercortisolismo (Stenzel-Poore, M.P. et al. 1992) y animales que no expresan CRH, los cuales tienen bajos niveles de glucocorticoides que parecen no afectar a los animales adultos pero si son necesarios durante el desarrollo embrionario (Muglia, L. et al. 1995).

La ACTH estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides por parte de la corteza adrenal. Actúa sobre un receptor de membrana que transduce su señal por la vía de cAMP. En las células de la corteza adrenal, activa las enzimas de las vías biosintéticas de los esteroides conduciendo a un aumento de la síntesis y secreción de glucocorticoides.

Los glucocorticoides actúan también directamente a nivel de la hipófisis y del hipotálamo (Dallman, M.F. et al. 1987) inhibiendo la activación del eje. Estos efectos de los glucocorticoides son mediados por receptores de corticosteroides. Existen dos tipos de receptores con diferente afinidad por la corticosterona y

glucocorticoides sintéticos (Reul, J.M.H.M. et al. 1985). El receptor del tipo I es el receptor clásico de mineralocorticoides con alta afinidad para aldosterona. El receptor del tipo II tiene mayor afinidad por los glucocorticoides corticosterona y dexametasona (Reul, J.M.H.M. et al. 1985, Veldhuis, H.D. et al. 1982). Ambos receptores han sido clonados (Arriza, J.L. et al. 1987, Hollenberg, S.M. et al. 1985, Evans, R.M. 1988).

El eje HPA es de fundamental importancia en el control del sistema inmune. La importancia del funcionamiento del mismo en el normal desarrollo de la respuesta inmune fue demostrado estudiando las alteraciones inmunes producidas por lesiones en diversas áreas hipotalámicas como así también los efectos de la hipofisectomía y adrenalectomía (Bateman, A. et al. 1989). También se utilizaron modelos animales, como las ratas Lewis (Sternberg, E. 1989) o las gallinas de la cepa obesa OS (Wick, G. et al. 1993) que presentan enfermedades autoinmunes debido a defectos en diferentes niveles del eje HPA (Wick, G. et al. 1993). Experimentos llevados a cabo con ratas de la cepa Lew/N y Fisher (F344/N) ponen en evidencia el rol protector de los glucocorticoides de los efectos nocivos de una respuesta inmune exacerbada (Sternberg, E. et al. 1989). Se ha observado que alteraciones de la producción de CRH afectan algunas funciones inmunes en estas cepas. Por ejemplo, ratas de la cepa Lew/N son susceptibles a la inducción de artritis por una inyección de la pared celular de estreptococos. Estas ratas muestran un defecto en la síntesis y en la secreción de la CRH hipotalámica, con la consecuente reducción en la actividad del eje HPA (Sternberg, E. 1989). Cuando las ratas Lew/N son tratadas con dexametasona se pierde la susceptibilidad a la inducción de la artritis. Por otro lado, las ratas Fisher 344/N, genéticamente relacionadas con las Lew/N, son resistentes a la inducción de artritis y muestran un sistema CRH hipotalámico funcionalmente normal. Comparando los patrones de respuestas hormonales de las ratas Fisher (F344/N) (no susceptibles a desarrollar artritis) con las ratas Lew/N (susceptibles) se

observan diferencias en ACTH y glucocorticoides plasmáticos, como consecuencia de la inyección de IL-1 $\alpha$ , CRH, SCW y el agonista serotoninérgico quizapine todos ellos activadores del eje HPA por diferentes mecanismos. Las ratas Lew/N muestran una respuesta del eje HPA disminuída con respecto a las ratas Fisher. La inhibición de los efectos de los glucocorticoides en las ratas Fisher con el antagonista de glucocorticoides RU 38486 o con el antagonista serotoninérgico LY53857, posibilita la inducción de artritis en estos animales (Sternberg, E. 1989). Dichos experimentos ponen en evidencia el posible rol de los glucocorticoides en el desarrollo de procesos autoinmunes.

Otro modelo animal que muestra la importancia de las hormonas del eje HPA en la regulación de la respuesta inmune es la cepa de gallinas obesas (obese chicken strain). Estos animales desarrollan espontáneamente una tiroiditis autoinmune con características similares a la tiroiditis de Hashimoto que afecta a humanos. Entre las alteraciones inmunes presentan hiperreactividad de las células T y expresión aberrante de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (Wick, G. et al. 1989, Kroemer, G. et al. 1989). Los niveles de glucocorticoides totales encontrados son normales pero los niveles de globulinas que unen glucocorticoides son el doble de los niveles normales, por lo tanto la actividad neta de los glucocorticoides se encuentra disminuída. La hiperreactividad de las células T y su infiltración en la tiroides disminuye con la administración de glucocorticoides (Faessler, R. et al. 1988). La respuesta de los glucocorticoides frente a la estimulación con antígenos no se registra en estos animales. No se conocen los mecanismos por los cuales se desarrolla este tipo de enfermedad autoinmune pero las interacciones entre el sistema neuroendócrino y el inmune juegan un papel fundamental (Wick, G. et al. 1993).

#### 4.1.1. CRH Y SISTEMA INMUNE

Estudios sobre los efectos centrales de CRH muestran que tendría esencialmente un rol inhibitorio sobre la respuesta inmune (Irwin, M. 1994). La CRH administrada icv produce una supresión de la actividad de las células NK de bazo de rata y anticuerpos anti-CRH antagonizan la supresión de la actividad citotóxica de las NK y de la proliferación de linfocitos T inducida por stress (Irwin, M. et al, 1987, 1990, Irwin, M. 1994). La administración crónica de CRH a nivel central produce una inhibición de la proliferación de esplenocitos pero al mismo tiempo aumenta los niveles de expresión de IL-1 e IL-2 (Labeur, M. et al. 1995). La infusión intracerebroventricular (icv) de IL-1 en ratas produce la rápida supresión de varias respuestas de linfocitos periféricos. Esta supresión se evita completamente con la infusión de anticuerpos anti-CRH en el ventrículo lateral y parcialmente con el bloqueo de la transmisión neural en los ganglios simpáticos (Sundar, S.L. et al, 1989; 1990). Estos resultados sugieren que tanto IL-1 como CRH son mediadores de los efectos inmunosupresores del stress.

Además de sus efectos a nivel central, la CRH tiene efectos directos sobre las células del sistema inmune (Chrousos, G.P. et al. 1995). Hay varios ejemplos descritos sobre la acción de la CRH sobre la proliferación celular. Por ejemplo, estimula la proliferación de células mononucleares periféricas en presencia o en ausencia de mitógenos como Con A (concanavalina A), PHA (phitohemaglutinina) y PWM (pokeweed mitogen) (Singh, V. et al. 1989). También estimula la proliferación de linfocitos en presencia de mitógenos dependientes de células T, principalmente Con A, y de monocitos aislados (Singh, V. et al. 1989). En humanos el efecto proliferativo no es mediado por células B, (Singh, V. et al 1990) pero en esplenocitos de rata la respuesta proliferativa de los linfocitos se registra sólo en poblaciones enriquecidas en linfocitos B y no en linfocitos T o macrófagos.

Tampoco se detectan efectos de CRH sobre la proliferación de esplenocitos de rata (McGillis, J.P. et al, 1989).

Existen discrepancias sobre los efectos de CRH sobre la actividad NK (natural killer). Algunos autores encontraron que la CRH inhibe la actividad "natural killer" *in vitro* (Pawlicovsky, M. et al. 1988, Gatti, G. et al. 1992). Sin embargo, otros reportaron que la CRH no tiene efecto sobre la actividad NK *in vitro* (Singh, V. et al. 1989) o que la aumenta por un mecanismo dependiente de receptores opioides. Este último efecto es compartido con arginina vasopresina (Carr, D.J.J. et al. 1990).

También hay discrepancias en la bibliografía sobre los efectos de CRH *in vitro* en relación a la modificación de parámetros que representan el estado de activación del sistema inmune. Por ejemplo, algunos autores observaron que la CRH aumenta *in vitro* la cantidad de células que expresan el receptor de IL-2, como parámetro de activación, en preparados de células T (Singh, V. et al. 1989). En células mononucleares periféricas, la CRH por sí misma estimula la producción de IL-6. Cuando se agrega LPS en combinación con CRH a estos cultivos, la producción de IL-6 no se modifica con respecto a la estimulada sólo por CRH. La producción de IL-6 en respuesta a CRH se registra en la fracción aislada de monocitos pero no en la fracción de linfocitos (Lew, S.C. et al. 1992). También se ha observado que la CRH puede estimular la producción de IL-1 e IL-2 en preparaciones de células mononucleares en condiciones basales y además puede aumentar la expresión de IL-1 estimulada por LPS y la de IL-2 estimulada por PHA (Singh, V. et al. 1990). En cambio otros autores reportaron que hay un efecto inhibitorio de CRH sobre la producción de IL-1 e IL-6 inducida por LPS en monocitos (Hagan, P. et al. 1992). Anticuerpos anti-IL-1 suprimen la estimulación de IL-6 por LPS, pero dado que la inhibición de CRH sobre IL-6 no es aditiva, el

efecto de CRH sobre IL-6 sería mediado por la inhibición de IL-1 (Hagan, P. et al. 1992). Hasta el momento no se han aclarado las causas de estas diferencias.

Fuera del sistema nervioso central, sitios de unión específicos para CRH fueron localizados en los ganglios simpáticos, en el tejido cromafín de la médula adrenal y en otros órganos como el páncreas, el intestino, el bazo y esplenocitos murinos (Dave, J.R. et al. 1985, Webster, E.L. 1989, Audhya, T. et al. 1991). Se ha descrito también la presencia de receptores de CRH en células mononucleares, linfocitos T (CD4+) (Singh, V. et al. 1988; Webster, E.L. et al. 1990). Este receptor transduce su señal a través del aumento intracelular de cAMP (Audhya, T. et al. 1991, Webster, E.L. et al. 1989) y es el mediador de los efectos directos de CRH observados *in vitro* en células del sistema inmune.

Además de la presencia de receptores de CRH en células del sistema inmune, se ha detectado la presencia de RNA mensajero de CRH en el timo y el bazo y la liberación de CRH en timocitos y esplenocitos (Orth, D.N. 1992, Aird, F. et al. 1993). Estos resultados sugieren que podrían existir interacciones autócrinas o parácrinas en los efectos inmunomoduladores de CRH. Por hibridización *in situ* se ha demostrado la síntesis de RNA mensajero de CRH en linfocitos T, B y neutrófilos pero no en monocitos, hecho confirmado por Northern blot y RIA (Stephanou, A. et al. 1990). La CRH sintetizada por los linfocitos T es estimulada por PHA (Ekman, R. et al. 1993). La producción de CRH por parte de linfocitos y esplenocitos también es estimulada por stress celular producido por hipertermia, hiperosmolaridad o hipoxia y por mitógenos como LPS o concanavalina A (Kravchenco, I. et al. 1994).

También se ha descrito recientemente que en los sitios de inflamación hay producción local de CRH (Karalis, K. et al. 1991). La CRH producida en los sitios de inflamación se detectó por inmunohistoquímica y también por RIA

encontrándose niveles similares a los encontrados en el hipotálamo y la placenta, dos órganos productores de CRH. Anticuerpos anti-CRH administrados intraperitonealmente en ratas con inflamaciones locales producidas por la inyección subcutánea de carragenina bloquean los síntomas de inflamación (Karalis, K. et al. 1991). Es improbable que los efectos de estos anticuerpos sean debidos a la neutralización de los efectos de CRH sobre la liberación de ACTH ya que ésta última originaría un estado de hipoglucocorticoidismo que contribuiría a exacerbar los síntomas inflamatorios. Además, la inyección local del anticuerpo en los sitios de inflamación bloqueó totalmente su desarrollo y, en animales inyectados con carragenina, los niveles plasmáticos de CRH se mantuvieron iguales a los de los controles. En base a estos resultados se postuló que CRH es uno de los mediadores de la inflamación actuando mediante mecanismos autócrinos o parácrinos (Karalis, K. et al. 1991). En ratas de la cepa Lewis que tiene deficiencias en la producción de CRH hipotalámica y que son susceptibles al desarrollo de artritis se encontraron altos niveles de CRH en las articulaciones inflamadas (Crofford, L.J. et al. 1992). Dado que hay producción de CRH en la médula espinal, la CRH encontrada en los sitios de inflamación podría ser aportada por los nervios periféricos. En las mismas articulaciones con artritis se encontraron sitios de unión para CRH (Crofford, L.J. et al. 1992). Estos resultados favorecen la hipótesis de que la CRH a nivel periférico actúa como un inmunoestimulador proinflamatorio.

#### 4.1.2. ACTH Y SISTEMA INMUNE.

Varios experimentos *in vivo* señalan la importancia del funcionamiento normal de la hipófisis para el desarrollo de la respuesta inmune. En este sentido se ha demostrado que la glándula pituitaria es necesaria para la protección de los efectos letales de *Salmonella typhimurium*: el 50 % de las ratas controles sobreviven mientras que todas las ratas hipofisectomizadas infectadas mueren en

pocos días (Edwards, C.K. et al. 1991). Estudiando los parámetros inmunes en ratas hipofisectomizadas se encontró que reduce la síntesis de anticuerpos, la citotoxicidad de las NK, la producción de IL-2 y la síntesis de TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados por LPS (Exon, J.H. et al. 1990; Edwards, C.K. et al. 1991). Estos resultados explican la baja supervivencia de los animales hipofisectomizados frente a las infecciones.

Las células del sistema inmune presentan receptores para la hormona hipofisaria ACTH (Smith, E.M. et al. 1987, Clarke, B.L. et al. 1989). Por ejemplo, se ha demostrado la presencia de los mismos en poblaciones celulares del bazo de ratones, los cuales presentan 2 afinidades distintas de unión para la ACTH (Johnson, H.M. et al. 1982). La cantidad de receptores expresados en células del sistema inmune son comparables a los encontrados en células de la corteza adrenal sensibles a ACTH.

También se ha observado que la activación de los esplenocitos con mitógenos produce un aumento de los receptores de ACTH (Smith, E.M. et al. 1987, Clarke, B.L. et al. 1989).

Se han observado distintos efectos directos de ACTH sobre células del sistema inmune. Por ejemplo, la ACTH inhibe la producción de anticuerpos dependiente o independiente de las células T (Johnson, H.M. et al. 1982). Otros autores observaron un aumento en la proliferación de células B y en la producción de anticuerpos inducidos por ACTH (Alvarez-Mon, M. et al. 1985). Más recientemente se observó que ACTH tiene un efecto bifásico sobre la producción de anticuerpos dependiendo de la dosis. En bajas concentraciones se induce la secreción de IgM por la línea murina de células B, mientras que, en altas concentraciones inhibe dicha secreción (Bost, K.L. et al. 1990).

ACTH tiene efectos inhibitorios sobre la producción y función de IFN- $\gamma$ . Esta hormona suprime la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T (Johnson, H.M. et al. 1984) y bloquea la función del IFN- $\gamma$  de estimular la actividad tumoricida de los macrófagos (Koff, W.C. et al. 1985).

Existe una familia de péptidos con actividad inhibitoria de los efectos de ACTH, llamados corticostatinas. Se han descrito varios tipos de corticostatinas que desplazan la unión de ACTH a su receptor. Son producidas en diversos tejidos y también en células del sistema inmune como neutrófilos, macrófagos y monocitos (Solomon, S. 1993).

#### 4.1.3. GLUCOCORTICOIDES Y SISTEMA INMUNE

Los glucocorticoides tienen un rol fisiológico fundamental en la respuesta al estrés: previenen una respuesta exagerada durante la activación de los mecanismos de defensa. Estos mecanismos de defensa son protectores en sus fases iniciales y actúan bajo una estricta regulación pero pueden dar origen a patologías cuando están fuera de control (Munck, A. et al. 1984).

El rol de los glucocorticoides ha sido demostrado por el uso de diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*: por remoción de los glucocorticoides endógenos (adrenalectomía ó administración de antagonistas del receptor de glucocorticoides), o bien por administración de glucocorticoides exógenos (Munck, A. et al. 1984).

Como ya se enunció, los glucocorticoides mediante un feedback negativo inhiben la activación del eje HPA. Actúan sobre el hipotálamo y la hipófisis inhibiendo la producción de CRH y de ACTH. Además de este mecanismo de autorregulación, también están involucrados directamente en la regulación de la respuesta inmune. Se ha demostrado que la adrenalectomía incrementa la sensibilidad a la

acción letal del LPS (Abernathy, R.S. et al. 1957, Swingle. W.W. 1944) y del TNF- $\alpha$ . Este efecto de sensibilización puede ser imitado inhibiendo los efectos protectores de los glucocorticoides con el antagonista del receptor de glucocorticoides RU38486 (Lazar, G. et al. 1986, Hawes, A.S. et al. 1992). En estudios metabólicos y analizando la respuesta de animales sensibles o resistentes a LPS, se determinó que los glucocorticoides protegen de los efectos tóxicos del LPS (Berry, L. et al. 1964, Gadina, M. et al. 1991). Por otro lado existen evidencias de que la susceptibilidad a la acción letal del LPS y TNF- $\alpha$  varía con el ritmo circadiano siguiendo el mismo patrón que la liberación de glucocorticoides (Langevin, T. et al. 1987).

Distintos tejidos linfocitarios, por ejemplo el bazo y el timo, o distintas especies presentan distinta sensibilidad a los glucocorticoides pero ésta no está correlacionada con el número de receptores de glucocorticoides presentes ni con la afinidad de los mismos (Baxter, J.D. et al. 1972). Variaciones en el número de receptores de glucocorticoides durante el ciclo celular o seguidos por una estimulación mitogénica (con un aumento al doble o triple), no ocurren en paralelo con un cambio en la sensibilidad (Smith, K.A. et al. 1977, Crabtree, G.R. et al. 1980, Cupps, T.R. et al. 1982). Estas diferencias en el funcionamiento de los receptores de glucocorticoides podría deberse a la participación de otros factores entre los cuales las citoquinas cumplirían un rol fundamental.

Los glucocorticoides son ampliamente usados como drogas antiinflamatorias e inmunosupresoras en la clínica. Sus efectos antiinflamatorios son debidos en parte a la inhiibición de la inducción de sustancias vasoactivas mediante el bloqueo del metabolismo del ácido araquidónico, el cual actúa como segundo mensajero produciendo vasodilatación y cambiando la distribución del tráfico de células inmunes. Los mecanismos por los cuales los glucocorticoides producen inmunosupresión, incluyen: la lisis de linfocitos, la inhibición de la proliferación y

función linfocitaria y la redistribución del tránsito linfocitario (Dracott, B.N. et al. 1979, Cupps, T.R. et al. 1982).

Los glucocorticoides producen una rápida redistribución de las poblaciones de linfocitos. Producen una linfopenia transiente y los niveles normales de linfocitos circulantes se recuperan a las 24 horas (Fauci, A.S. 1976). Los mecanismos mediante los cuales los glucocorticoides modulan el tránsito linfocitario no se conocen en detalle, pero se ha demostrado que producen cambios en la expresión de proteínas de membrana asociadas a los cambios de patrones de circulación (Woodruff, J. et al. 1968). La base de estos efectos es el cambio en las propiedades de adhesión y quimiotaxis de distintas poblaciones de células inmunes. Por ejemplo, inhiben la expresión de las moléculas de adhesión ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule 1) e ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) en células endoteliales estimuladas con endotoxinas (Cronstein B.N. et al. 1992), lo cual inhibe el tránsito de linfocitos hacia los tejidos inflamados.

Los glucocorticoides también inhiben la proliferación de linfocitos T estimulada por Con A o PHA mientras que los linfocitos B estimulados con PWM son resistentes (Gillis, S. et al. 1979, Palacios, R. et al. 1982). Estos efectos fueron confirmados en estudios *in vivo* (Cupps, T.R. et al. 1982). Además de los efectos sobre la proliferación tienen efectos sobre la diferenciación celular, por ejemplo, inhiben la diferenciación de los macrófagos (Cupps, T.R. et al. 1982, Baybutt, H.N. et al. 1990). También intervienen en el proceso de diferenciación intratímica modulando la proporción entre distintas subpoblaciones de timocitos (Screpanti, I. et al. 1989). Los glucocorticoides participan en el proceso de selección clonal de células tímicas no reactivas durante su maduración. Son capaces de inducir la lisis de las células T inmaduras presentes en la corteza del timo y las células B foliculares. Sin embargo, las células T maduras (medulares) y las células B

activadas, son relativamente resistentes a la muerte celular inducida por glucocorticoides (Cohen, J.J. et al. 1984).

Han sido reportados diversos efectos de los glucocorticoides sobre la actividad de células NK. Diferentes autores en distintos modelos han encontrado tanto efectos supresores como estimuladores en ensayos *in vivo* (Onsrud, M. et al. 1981, Parrillo, J.E. et al. 1978). También se han encontrado distintos efectos *in vitro* sobre la actividad NK (Parrillo, J.E. et al. 1978).

La producción de citoquinas es afectada en forma directa por los glucocorticoides. Se observó que los glucocorticoides inhiben la transcripción de IL-1 $\beta$  en ensayos de transcripción *in vitro* con núcleos aislados de células de la línea monocítica U-937 previamente tratadas con glucocorticoides y estimuladas con LPS o ésteres de forbol (Lee, S. et al. 1988). Los efectos inhibitorios sobre la transcripción de IL-1 $\beta$  son ya muy marcados a las tres horas del agregado de dexametasona (Lee, S. et al. 1988). Otro de los mecanismos por los cuales los glucocorticoides inhiben la expresión de IL-1 es mediante el aumento de la degradación de su RNA mensajero. En este caso, el mRNA de IL-1 $\beta$  estimulado por LPS en presencia de dexametasona comienza a decaer a las tres horas pero su efecto es más notorio recién a las seis horas (Lee, S. et al. 1988, Knudsen, P.J. et al. 1987). Los glucocorticoides disminuyen la producción de IL-2 a nivel transcripcional mediante la unión de su receptor activado a sitios específicos en la zona regulatoria del gen (Gillis, S. et al. 1979, Boumpas, D.T. et al. 1991, Vacca, A. et al. 1992). También hay un efecto inhibitorio a nivel postranscripcional tanto de IL-2 como de su receptor (Boumpas, D.T. et al. 1991, Reed, J.C. et al. 1986). Además inhiben la transcripción de IL-3 y la acumulación de mRNA de interferón- $\gamma$  (Arya, S.K. et al. 1984). La producción de TNF- $\alpha$  es suprimida por glucocorticoides (Beutler, B. et al. 1986; Parant, M. et al. 1991). También IL-6, IL-8, GM-CSF y G-CSF liberados en respuesta a diferentes estímulos son inhibidos por

glucocorticoides (Waage, A. et al. 1990, Tobler, A. et al. 1992, Hamilton, J.A. et al. 1992).

Sin embargo, algunas interacciones entre los glucocorticoides y las citoquinas presentan patrones de regulación más complejos. Por ejemplo, la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos peritoneales estimulados con LPS *in vitro* es inhibida por glucocorticoides. Esta inhibición es parcialmente revertida por IFN- $\gamma$  (Luedke, C.E. et al. 1990). Sin embargo, IL-4 potencia el efecto inhibitorio de los glucocorticoides sobre IL-1, TNF- $\alpha$  y prostaglandina E2 en monocitos humanos (Hart, P. et al. 1990). Por otro lado, cuando el estímulo para la producción de TNF o IL-1 es el forbol miristato acetato (PMA), los glucocorticoides no tienen efecto (Debets, J.M. et al. 1989). Los efectos inhibitorios de los glucocorticoides tienen lugar a nivel transcripcional, por lo tanto es probable que la ausencia de efectos sobre la estimulación por PMA puede deberse a un efecto estabilizador del PMA sobre el mRNA de estas citoquinas (Akira, S. et al. 1990).

Además de los efectos inhibitorios de los glucocorticoides sobre IL-1 ya mencionados, nuestro grupo ha demostrado recientemente que los glucocorticoides suprimen la expresión de IL-1ra estimulada por LPS en monocitos humanos (Arzt, E. et al, 1994). Esta inhibición puede ser mediada en parte por el receptor de mineralocorticoides que es expresados por los monocitos (Sauer, J. et al. 1995). Esta participación del receptor de mineralocorticoides podría estar relacionada con la formación de heterodímeros de receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides que ha sido recientemente demostrada en células del sistema nervioso (Trapp, T. et al. 1994). Estos datos tomados en conjunto parecen paradójicos dado que un agente antiinflamatorio inhibe a un mediador de la inflamación y también a su antagonista endógeno. Sin embargo, se explican por el rol que tienen los glucocorticoides de prevenir una excesiva reacción del sistema inmune. En este caso los glucocorticoides cumplirían con el

papel de reprimir la expresión de todo el sistema de IL-1 para devolverlo a una situación de homeostasis. Por lo tanto, existe una regulación fina del sistema de la IL-1 que involucra a los glucocorticoides y podría hipotéticamente también involucrar a otras hormonas del eje HPA. La potencialidad de aplicaciones terapéuticas y la necesidad de una mejor comprensión del rol en patologías relacionadas justifican la realización de estudios más profundos sobre los mecanismos de acción de los glucocorticoides y los posibles efectos de otras hormonas.

Los glucocorticoides a pesar de sus efectos inmunosupresores tienen efectos estimulatorios sobre la expresión del receptor de IL-1. En linfocitos B se ha demostrado que los glucocorticoides aumentan el número de sitios de unión de IL-1 (Akahoshi, T, et al. 1988). Así por ejemplo se observó un aumento de los receptores para IL-1 en linfocitos B, fibroblastos y varias líneas celulares (Gottschall, P.E. et al. 1991), pero no en linfocitos T, ni en monocitos (Akahoshi, T, et al. 1988). Por otra parte, en otras células inmunes, polimorfonucleares y líneas celulares monocíticas los glucocorticoides aumentan la expresión del receptor de IL-1 tipo II (Re, F. et al. 1994). El aumento de la unión de IL-1 debido al receptor tipo II podría inhibir los efectos de IL-1 al no transducir señal y competir con el receptor funcional tipo I como ya se mencionó en la sección 2.3. De esta manera, el efecto final de los glucocorticoides sobre la acción de IL-1 sería inhibitorio.

En el caso de los receptores para IL-6, los glucocorticoides actúan aumentando su expresión en distintas líneas celulares como en las de hepatoma humano, monocítica humana U-937, linfoma BMNH y epiteliales (Snyers, L. et al. 1990).

Las bases moleculares de estos efectos de los glucocorticoides sobre la expresión génica de citoquinas han sido estudiados. Los receptores de glucocorticoides se encuentran presentes en la mayoría de los tipos celulares del sistema inmune y median sus potentes efectos inmunosupresores (Munck, A. et al.

1984). También se identificaron secuencias de DNA conservadas correspondientes a los sitios de reconocimiento del receptor activado de glucocorticoides (GRE) en el extremo 5' de varios genes que codifican para citoquinas (Akira, S. et al. 1990). Estas secuencias serían los blancos directos de los receptores activados responsables de la inhibición de la transcripción. En los últimos años se han acumulado evidencias de que los mecanismos de transducción de señales pueden interaccionar entre sí dando como resultado respuestas más específicas y flexibles. Por otro lado, existen evidencias de que el receptor activado de glucocorticoides puede interactuar con factores de transcripción como NF $\kappa$ B ó AP-1 (Truss, M. et al. 1993). Estas interacciones son importantes para la regulación de la transcripción de los genes de muchas citoquinas y moléculas de adhesión que median efectos inflamatorios. Por ejemplo, el receptor de glucocorticoides activado por sus ligandos reprime la activación de la transcripción de la molécula de adhesión ICAM mediada por el factor NF- $\kappa$ B (Caldenhoven, E. et al. 1995). Los glucocorticoides también activan la transcripción del inhibidor de NF- $\kappa$ B llamado I $\kappa$ B (Scheinman, R.I. et al. 1995, Auphan, N. et al. 1995).

Se han descrito alteraciones de algunos parámetros del funcionamiento del sistema inmune en patologías neuroendócrinas que afectan los niveles de glucocorticoides. Por ejemplo, los linfocitos de pacientes con hipercortisolismo (enfermedad de Cushing) producen menor cantidad de IL-2 que los pacientes con hipocortisolemia debida a insuficiencia adrenal (Sauer, J. et al. 1994). Los niveles endógenos plasmáticos de glucocorticoides presentan una relación inversa con el peso del bazo, el número de células mononucleares, y los niveles basales de células secretoras de inmunoglobulinas (Besedovsky, H. et al 1992). La administración de glucocorticoides exógenos induce la involución del timo, y disminuyen el número de timocitos, esplenocitos y de linfocitos circulantes periféricos (Dracott, B.N. et al. 1979).

## 5. EFECTOS DE LAS CITOQUINAS SOBRE EL SISTEMA NEUROENDOCRINO

Es sabido que durante procesos infecciosos, inflamatorios o neoplásicos se producen cambios endócrinos y comportamentales. Estudios pioneros de Besedovsky en el año 1977 demostraron que existe una comunicación desde el sistema inmune hacia el sistema nervioso central que es mediada por las citoquinas secretadas por el sistema inmune (Besedovsky, H. et al. 1992). Las citoquinas actúan a nivel del sistema nervioso central regulando diferentes funciones y en particular tienen efectos sobre el sistema neuroendócrino regulando la actividad del hipotálamo, la pituitaria y la glándula adrenal (Besedovsky, H. et al. 1992). Los estudios iniciales consistieron en la observación de los efectos centrales y endócrinos de la administración de antígenos o citoquinas. Por ejemplo, fue detectado un aumento en la tasa de descarga neuronal en el núcleo ventromedial pero no en el núcleo anterior del hipotálamo de la rata tres días después de la administración de un antígeno (Besedovsky, H. et al. 1992). El mismo tratamiento produce cambios en la actividad del núcleo paraventricular y en el área preóptica anterior del hipotálamo (Saphier, D. et al. 1987). Para caracterizar los factores que median estos efectos y su origen se usaron medios condicionados por células del sistema inmune. Una disminución en la concentración de NA en las neuronas NA del hipotálamo y del tronco cerebral fue inducida por una inyección ip de sobrenadantes obtenidos de esplenocitos estimulados por Con A (Besedovsky, H. et al. 1983). Así, productos secretados por linfocitos activados, son capaces de estimular regiones específicas dentro del sistema nervioso central, ya sea directa o indirectamente. En estudios posteriores estos factores liberados por los linfocitos fueron identificados como interleuquinas, entre las cuales la IL-1 tiene los efectos más marcados. Sobrenadantes de cultivo de linfocitos infectados con virus capaces de inducir la liberación de ACTH perdieron esta capacidad cuando se incubaron con anticuerpos neutralizantes anti-IL-1 (Besedovsky, H. et al. 1992). Entre las

acciones neuroendócrinas de IL-1 se destaca la estimulación de CRH, norepinefrina y dopamina en el hipotálamo (Besedovsky 1992, Bateman, A. et al. 1989). El sitio de acción de IL-1 en la estimulación de la liberación de CRH es el hipotálamo dado que se ha observado el efecto directo de IL-1 sobre esta estructura *in vitro* (Sapolsky, R. et al. 1987, Berkenbosch, R. et al. 1987, Tsagarakis, S. et al. 1989). En el hipotálamo se han encontrado receptores para IL-1 tipo I funcionales localizados en la eminencia media (Cunningham, E.T. et al. 1992, Matta, S.G. et al. 1993, Bateman, A. et al. 1989, Takao, T. et al. 1993). Por otra parte, los núcleos productores de CRH están inervados por neuronas productoras de IL-1 (Breder, C.D. et al. 1988). En estudios *in vivo* con anticuerpos anti-CRH se determinó que el incremento en los niveles de CRH es un paso esencial en la estimulación de la producción de ACTH y glucocorticoides por parte de la IL-1 (Uehara, A. et al. 1987). También se observó que lesiones del núcleo paraventricular del hipotálamo, sitio donde se produce CRH, bloquean la inducción de ACTH y glucocorticoides por IL-1 (Rivier, C. et al. 1993). Por otra parte, la inyección intraperitoneal de anti-IL-6 antes de la aplicación de IL-1, bloquea la elevación de los niveles plasmáticos de ACTH inducidos por IL-1 (Perlstein, R.S. et al. 1993), lo cual demuestra que los efectos de IL-1 están mediados por IL-6. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la IL-1 estimula la producción de CRH todavía no son claros.

La glándula hipófisis constituye un nexo entre el cerebro y los sistemas endócrino e inmune y por lo tanto es el órgano blanco de muchas acciones de las citoquinas sobre el sistema neuroendócrino y es responsable de muchos de los efectos que las citoquinas producen sobre este sistema. La IL-1 puede actuar directamente a nivel de la hipófisis induciendo la liberación de ACTH. Esto ha sido demostrado en cultivos prolongados de células normales de hipófisis (Bernton, E.W. et al. 1987, Bateman, A., et al. 1989, Hermus, A. et al. 1990). Recientemente se ha descrito que la CRH facilita la inducción de la liberación de ACTH por IL-1 en

células corticotróficas (Payne, L.C. et al. 1994). Dado que la IL-1 es producida intrínsecamente en esta glándula, también es posible que regule la liberación de ACTH y otras hormonas hipofisarias por mecanismos autócrinos o parácrinos (Spangelo, B.L. et al. 1995).

Aunque es probable que *in vivo* el mecanismo más importante para la inducción por IL-1 de la síntesis de glucocorticoides sea mediada por CRH y ACTH, se ha demostrado que la IL-1 también es capaz de inducir directamente la síntesis de esteroides en la glándula adrenal (Roh, M.S. et al. 1987, Hermus, A.R.M.M. et al. 1990). En forma análoga, también es capaz de inducir la síntesis de esteroides en otros órganos blanco como ovario o testículos (Hermus, A.R.M.M. et al. 1990). La IL-1 puede estimular la producción de glucocorticoides en glándulas adrenales aisladas *in vitro* como así también en cultivos celulares de corteza adrenal (Roh, M.S. et al. 1987, Salas, M. et al. 1989).

Otras citoquinas inflamatorias, como IL-6 y TNF- $\alpha$ , tienen efectos similares (Spangelo, B.L. et al. 1995). El TNF- $\alpha$  produce, por administración i.v. en la rata, el aumento de ACTH plasmática y estimula la secreción de ACTH por acción directa sobre las células de la pituitaria (Bernardini, R. et al. 1990, Gaillard, T.R. et al. 1990). Sin embargo, *in vitro*, el TNF- $\alpha$  inhibe la secreción de ACTH estimulada por CRH y no tiene ningún efecto sobre las células de la hipófisis o del hipotálamo (Navarra, P. et al. 1991). En el caso de IL-2, ha sido demostrado que estimula la expresión del gen de POMC y la liberación de ACTH *in vitro* (Brown, S.L. et al. 1987, Low, K.G. et al. 1987; Karanth, S. et al. 1991, Smith, L.R. et al. 1989). *In vivo*, eleva los niveles de  $\beta$ -endorfina, ACTH y cortisol en pacientes humanos con cancer (Lotze, M.T. et al. 1985, Denicoff, K.D. et al. 1989). También induce el aumento de ACTH en ratas normales. Sin embargo, varios trabajos describen la ausencia de efectos de la IL-2 en estos sistemas pero según ha sido demostrado por los trabajos de Naito y colaboradores (Naito, Y. et al. 1989), las discrepancias

se deben a que la IL-2 tiene especificidad de especie y algunos trabajos previos no tuvieron en cuenta esta característica.

Las interleuquinas también tienen efectos sobre la diferenciación y el crecimiento de órganos del sistema neuroendócrino. Por ejemplo, la IL-1 estimula el crecimiento de astrocitos mientras que la IL-2 estimula a los oligodendrocitos. A su vez, la respuesta a la IL-2 está regulada a lo largo del desarrollo (Merril, J.E. et al. 1984, 1987, 1990). Se ha observado *in vitro* que algunas interleuquinas actúan como factores de crecimiento neuronal (Hama, T. et al. 1989, Kamegai, M. et al. 1989). Se ha demostrado que la IL-2 y la IL-6 regulan el crecimiento de células de la hipófisis (Arzt, E. et al. 1992). Fue descrito que mientras estas interleuquinas inhiben el crecimiento de células normales, estimulan la proliferación de células tumorales de la hipófisis sugiriendo que existe un cambio en la sensibilidad a las interleuquinas durante el proceso de transformación y desarrollo tumoral.

Estos, y otros resultados sugieren un rol fino de estas citoquinas en el control del crecimiento, diferenciación y función de ciertas estructuras del sistema neuroendócrino.

Además de ser mediadoras de la inflamación, las interleuquinas juegan un rol fisiológico como factores tróficos, neuromoduladores o neurotransmisores, ocasionando cambios a nivel endócrino y en el comportamiento del individuo. Se encuentran bien caracterizados los efectos centrales que ocasionan las citoquinas (de origen central ó periférico) y en particular la IL-1 y el TNF- $\alpha$  durante una infección, como hipertermia, aumento de la fase lenta del sueño, astenia, adinamia, anorexia y los efectos periféricos como artralgias e inhibición de la secreción ácida y del vaciamiento gástricos (Kent, S. et al. 1992).

## 6. EXPRESION DE INTERLEUQUINAS Y SUS RECEPTORES EN EL SISTEMA NEUROENDOCRINO

La base molecular y celular de los mecanismos responsables de la acción de las citoquinas en el sistema neuroendócrino es la expresión de sus receptores. Dado que además de expresar receptores para interleuquinas, los órganos neuroendócrinos también son productores de interleuquinas, esto hace posible la existencia de mecanismos autócrinos o parácrinos que controlan el funcionamiento del sistema neuroendócrino.

Además de las células inmunes, el sistema nervioso central es una de las fuentes productoras de linfoquinas. Por ejemplo, células de la micro y macroglía producen IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-3 (Okamoto, Y. et al. 1990, Liebermann, A.P. et al. 1989, Velasco, S. et al. 1991, Merrill, J.E. et al. 1987, 1990). En neuronas del hipocampo se describió la expresión de receptores para IL-1 e IL-2 (Takao, T. et al. 1990, Cunningham, E.T. et al. 1992, Ban, E. et al. 1991, 1993).

Entre las citoquinas identificadas en el sistema nervioso central se encuentran las interleuquinas 1, 2, 3, 6, IL-1ra, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF $\beta$  (Okamoto, Y. et al. 1990, Liebermann, A.P. et al. 1989, Velasco, S. et al. 1991, Merrill, J.E. et al. 1987, 1990). La expresión de estas citoquinas tiene lugar principalmente en células de la glía.

De todas estas citoquinas halladas en el sistema nervioso, algunas se han hallado en situaciones de homeostasis, en cambio otras han sido detectadas después de la inducción con mitógenos o antígenos o asociadas a daño cerebral. Las células de la glía cumplen funciones similares a las de las células del sistema inmune como fagocitosis, presentación de antígenos y secreción de citoquinas. La micro y macro glía posee la capacidad de secretar ciertas citoquinas en determinadas situaciones patológicas, aunque no este bien determinado su rol

patogénico, como por ejemplo, la secreción de IL-1, TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$  en la esclerosis múltiple, la de IL-1 en Alzheimer y TNF- $\alpha$  e IL-6 en meningitis bacteriana, HIV o injuria tisular (Morganti-Kossmann, M.C. et al. 1992).

Dentro del sistema nervioso central, también en estructuras con función endócrina se ha detectado la expresión de interleuquinas y sus receptores. IL-1 $\beta$  e IL-6 fueron halladas en células del hipotálamo (Breder, C.D. et al. 1988). IL-1 $\beta$  fue localizada en fibras del hipotálamo que inervan grupos de células endócrinas (Breder, C.D. et al. 1988). El antagonista del receptor de IL-1 se detectó por hibridización *in situ* en cerebelo, hipocampo y núcleo paraventricular del hipotálamo (Licino, J. et al. 1991). La presencia de IL-6 y del receptor de IL-6 fue detectada en el hipocampo y hipotálamo de rata por hibridización *in situ* (Schöbitz, B. et al. 1993) También la expresión del mRNA y liberación de IL-6 fue descrita en cultivos de células del hipotálamo (Spangelo, B.L. et al. 1990).

En la hipófisis fue demostrada la producción de IL-1. El material inmunoreactivo para IL-1 $\beta$  al igual que su mRNA encontrados en la pituitaria se incrementan después de un tratamiento inmunoestimulante con LPS (Koenig, J.I. et al. 1990). También se demostró recientemente la síntesis en adenomas de hipófisis de IL-1ra, predominantemente la forma intracelular (Sauer, J. et al. 1994). Se describió la expresión del receptor de IL-1 en células de pituitaria de ratón y células AtT-20 corticotróficas (Koenig, J.I. et al. 1990, Takao, T. et al. 1990). Por experimentos de unión y localización *in situ* se mostró la presencia del receptor de IL-1 tipo I en todo el lóbulo anterior de la hipófisis (Takao, T. et al. 1992). La expresión de este receptor es regulada por LPS en forma recíproca a la regulación ejercida sobre IL-1 y también es modulada por glucocorticoides (Takao, T. et al. 1993). La expresión de IL-1 y su receptor como así también de IL-1ra en la hipófisis provee las bases moleculares para interpretar las posibles acciones autócrinas y parácrinas de este sistema.

En células de la hipófisis anterior se demostró la producción de IL-6, estimulada por IL-1 (Spangelo, B.L. et al. 1991, Yamaguchi, M. et al. 1990). Además se detectó la expresión de IL-6 en pituitaria anterior de rata, cultivos de adenomas corticotróficos y cultivos de adenomas de pituitaria humanos (Vankelecom, H. et al. 1989, Spangelo, B.L. et al. 1990a, 1990b, 1990c, Velkeniers, B. et al. 1991, Jones, T.H. et al. 1991, 1993, 1994). Se encontró que células de la hipófisis anterior expresan receptores para IL-6 (Ohmichi, M. et al. 1992). También se observó la expresión de IL-2 y su receptor en líneas celulares hipofisarias de rata (Arzt, E. et al. 1992).

## 7. CIRCUITO DE FEEDBACK INMUNE-HPA

Los ejemplos enunciados arriba son algunas de las evidencias que conforman las bases moleculares y celulares de las vías de comunicación bidireccional y la interregulación entre el sistema neuroendócrino y las células inmunes (Besedovsky, H. et al. 1992, Chrousos, G.P. 1995, Spangelo, B.L. et al. 1995). Estos circuitos entre ambos sistemas cumplen el rol de informar a uno de ellos el estado de homeostasis, o no, en que se encuentra el otro. La existencia de estas interacciones funcionales posibilita que alteraciones producidas en uno de los sistemas resulte patológica sobre el otro. Cada uno de estos sistemas es capaz de recibir en forma específica distintas señales del medio ambiente. El sistema inmune está capacitado para captar estímulos que no son reconocidos por el sistema nervioso central y periférico por ejemplo la presencia de agentes infecciosos, tumores y daño celular (Bateman, A. et al. 1989). Este reconocimiento es transformado por las células inmunes en señales humorales que actúan sobre el sistema neuroendócrino (Besedovsky, H. et al. 1992). En respuesta, el sistema nervioso central y periférico libera hormonas neurotransmisores y neuropéptidos, que son reconocidas por las células del sistema inmune provocando cambios inmunológicos específicos (Blalock, J.E. 1984).

El conocimiento de estas vías de acción permitiría una posible acción farmacológica y terapéutica en el tratamiento de las enfermedades originadas en ambos sistemas.

Entre estos circuitos, en respuesta a una infección o inflamación, el individuo produce citoquinas inflamatorias, que entre otras actividades, pueden actuar a nivel hipotalámico, hipofisario o adrenal activando la liberación de CRH, ACTH y glucocorticoides (Besedovsky, H. et al. 1992, Chrousos, G.P. 1995). Estos, además de inhibir su propia liberación por feedback negativo a nivel hipotalámico, preservan al individuo de la sobreproducción de citoquinas a través de la inhibición de su síntesis, de su actividad biológica ó modulando la expresión de sus receptores.

La IL-1, la citoquina más importante en este circuito, integra un sistema inmune-HPA en el cual la inflamación conlleva un aumento en los niveles de IL-1 que, a su vez, induce la activación del eje HPA mediante los receptores de IL-1 localizados en los órganos neuroendócrinos. Esta activación da como resultado un incremento en la producción de glucocorticoides. Estos, como una señal de feedback, suprimen la respuesta inflamatoria y la producción de IL-1 (Besedovsky, H.A. et al. 1986, Hurme, M. et al. 1991).

Como lo demuestran los ejemplos enunciados en esta introducción, las interacciones entre los sistemas neuroendócrino e inmune son complejas y aún no se conocen en detalle. Sin embargo, de los datos obtenidos hasta el presente se desprende que el sistema inmune es capaz de modular al sistema neuroendócrino y esta interacción es recíproca debido a la existencia de mecanismos de feedback. Por otra parte, los sistemas neuroendócrino e inmune comparten la producción del mismo tipo de mensajeros y la expresión de sus receptores lo cual constituye la base de los mecanismos autócrinos y parácrinos

que modulan la actividad de ambos sistemas. Todas estas características de las interacciones entre ambos sistemas pueden encontrarse afectadas en asociación con diversas patologías y por lo tanto constituyen puntos interesantes para encarar la investigación de nuevas terapias y comprender mejor los mecanismos de acción de las ya conocidas.

## **B. OBJETIVOS**

Como se desprende de la introducción, la interacción entre IL-1 y el eje HPA es fundamental para el funcionamiento de las interacciones neuroinmunoendócrinas pero no se conocen los detalles de los mecanismos de regulación del sistema IL-1 por las hormonas HPA.

### **1. OBJETIVOS GENERALES**

Nuestro objetivo fundamental es caracterizar las interacciones regulatorias entre el sistema neuroendócrino y el sistema inmune para desarrollar posibles aplicaciones terapéuticas en patologías asociadas. Nuestro trabajo se focalizará en el estudio del balance de la expresión de los factores que conforman el sistema de IL-1 en monocitos, su regulación por CRH, ACTH y glucocorticoides y los mecanismos moleculares y celulares de esta acción regulatoria.

El estudio de la regulación de la expresión del gen del antagonista del receptor de IL-1 por células mononucleares contribuirá a aclarar el delicado balance inmunoregulatorio en procesos inflamatorios e infecciosos. Se espera entender el rol de las hormonas del eje HPA en esta regulación. Los resultados de este estudio podrían ser utilizados en la manipulación farmacológica del sistema IL-1ra / IL-1 en patologías como procesos autoinmunes y shock séptico.

### **2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

2.1. Caracterizar los efectos de las hormonas del eje HPA, CRH y ACTH, sobre la expresión del gen de IL-1ra y del gen de IL-1 $\beta$  midiendo los niveles de los correspondientes mRNA y proteínas producidos en monocitos.

2.2. Estudiar los efectos de CRH y ACTH sobre este sistema en combinación con LPS y determinar posibles interacciones en las vías de transducción de señales de estos factores.

2.3. Estudiar la posible participación de un loop autorregulatorio de IL-1 en la expresión de IL-1ra, particularmente bajo estimulación con LPS.

2.4. Profundizar la caracterización de los efectos de los glucocorticoides sobre el sistema de IL-1 (IL-1, IL-1ra y receptor de IL-1 tipo II). Determinar la participación de los glucocorticoides en la regulación de los circuitos descritos en el objetivo 2.3.

## C. MATERIALES Y METODOS

Todos los materiales utilizados en este trabajo, fueron adquiridos en las firmas Boehringer o Sigma, Alemania; salvo que se mencione el nombre de otras compañías, entre paréntesis, al lado de los productos.

El modelo experimental utilizado ha sido el cultivo primario de monocitos provenientes de dadores de sangre normales. Las células fueron utilizadas en condiciones basales o estimuladas con LPS o IL-1 $\beta$ , según cada protocolo experimental. Los cultivos de monocitos humanos fueron utilizados para estudiar la expresión de los genes de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y el receptor de IL-1 tipo II. Para medir acumulación de RNA se utilizó la técnica de Northern blot y se cuantificaron las correspondientes autorradiografías por densitometría. Las proteínas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  fueron medidas por ELISA.

### 1. CULTIVO DE MONOCITOS HUMANOS PERIFERICOS

Los experimentos del presente trabajo se realizaron con monocitos humanos obtenidos de sangre periférica de dadores normales sanos y libres de infecciones o tratamientos farmacológicos. La sangre venosa fue extraída por venopuntura, recogida en bolsas y separada en "buffy coats". Se centrifugó el contenido de los buffy coats a 200 g por 20 minutos, separando plasma y fracción celular. La fracción celular se sembró sobre Ficoll-Hypaque y en este gradiente se centrifugaron las células a 400 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células polimorfonucleares y los eritrocitos sedimentan, quedando una interfase enriquecida en células mononucleares. Esta se separó y se lavó tres veces con solución salina. Las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, EE.UU.) conteniendo 10<sup>5</sup> U/l de penicilina, 100 mg/l de estreptomicina, 2.5 mg/l de anfotericina B, 2mM de L-glutamina y 5 % de suero fetal bovino (Gibco,

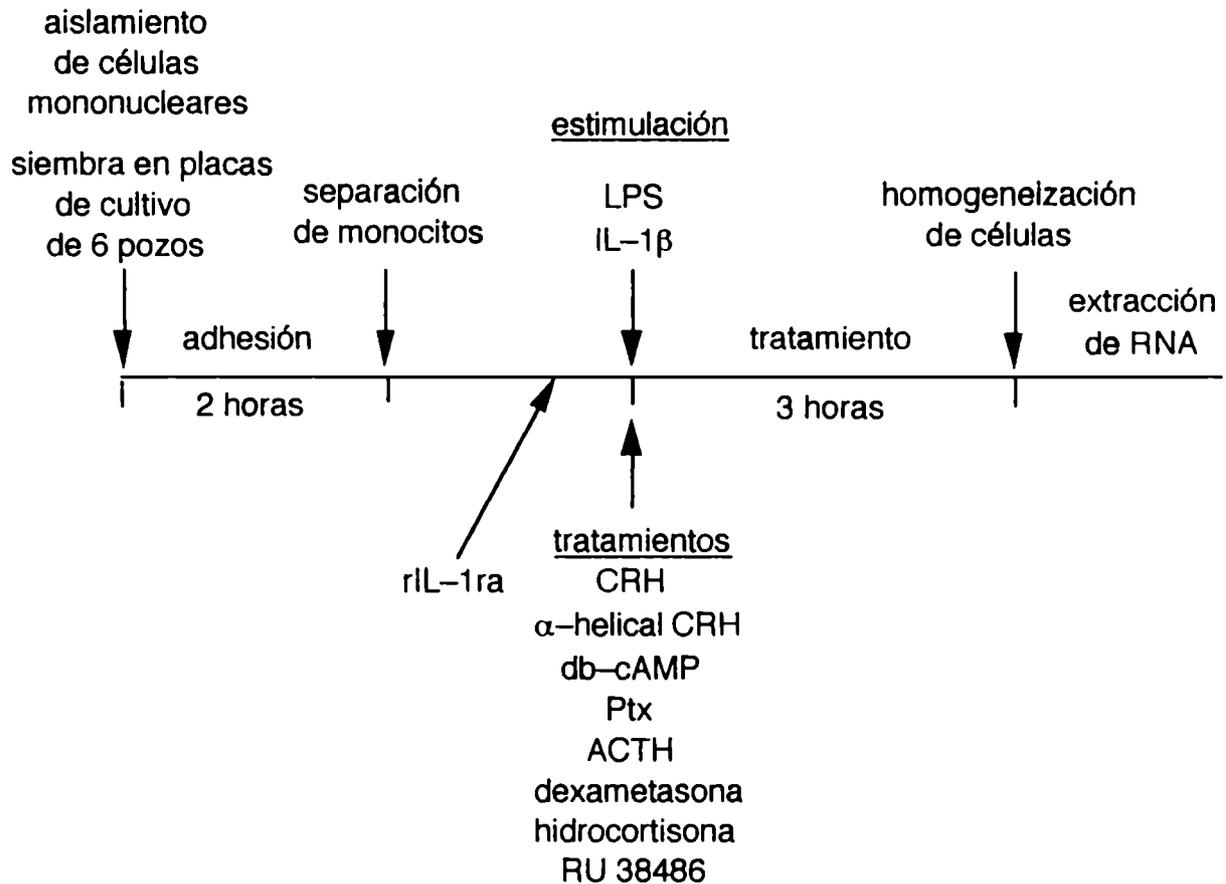
Grand Island, NY, EE.UU) inactivado (30' a 56°C) a pH 7.4. Luego se realizó el recuento celular diluyendo 1/100 una alícuota de células en una solución conteniendo ácido acético glacial al 4% en agua destilada con trazas de azul de metileno. Una alícuota se colocó en la cámara de Neubauer y se realizó la lectura con un aumento 100X. El rendimiento de células mononucleares periféricas obtenidas a partir de cada buffy coat fue usualmente entre 100 y 200 millones. También se verificó la viabilidad celular mediante la coloración diferencial con Azul de Tripano, considerando viables aquellas células capaces de excluir al colorante. Rutinariamente se obtuvieron preparaciones de células con una viabilidad superior a 95 %.

Finalmente, se ajustó la densidad celular a  $4 \times 10^6$  células/ml y se sembraron 2 ml por pozo en placas de cultivo de 6 pozos (Nunc, Dinamarca; Corning, EE.UU.).

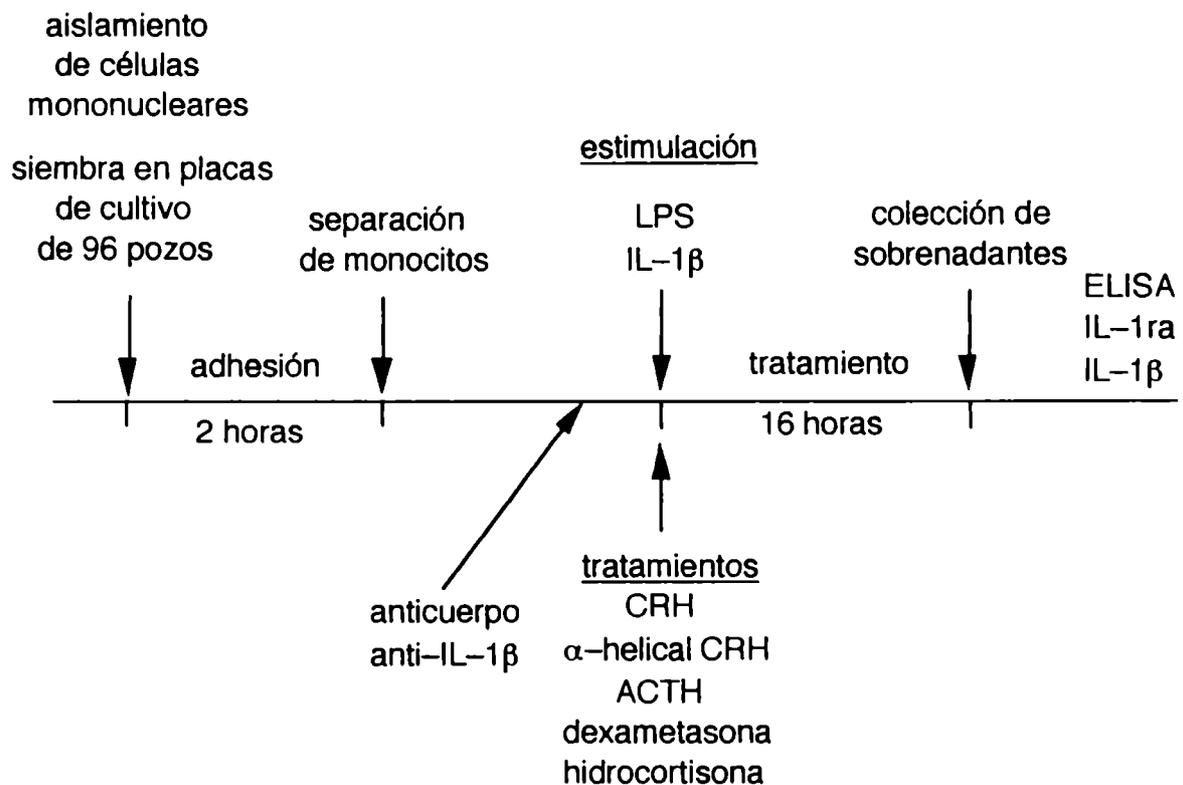
Las células mononucleares periféricas obtenidas como se indicó fueron incubadas a 37°C con atmósfera húmeda compuesta por 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % aire.

La purificación de monocitos se llevó a cabo por medio de la técnica de adhesión celular al plástico (Arzt, E. et al. 1988, Bertran, G. et al. 1992, Rinehart, J. et al. 1978). La incubación se llevó a cabo por 2 hs, al cabo de este tiempo, se retiró la fracción de células no adherentes. La capa de células adherentes fue lavada con medio de cultivo. Esta fracción resultó altamente enriquecida en monocitos siendo la contaminación con linfocitos T menor a 0.5 %. La determinación de la pureza de los cultivos se realizó por el método de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales marcadores de monocitos (CD14), de linfocitos B (CD19) y de linfocitos T (CD4, CD8) (Immunotech, Francia), incubando 30' a 4°C y lavando 2 veces con medio de cultivo. Luego se agregó 100µl de inmunoglobulina antiratón conjugada con fluoresceína. Se incubó y lavó nuevamente y se observó con objetivo de inmersión en microscopio de fluorescencia.

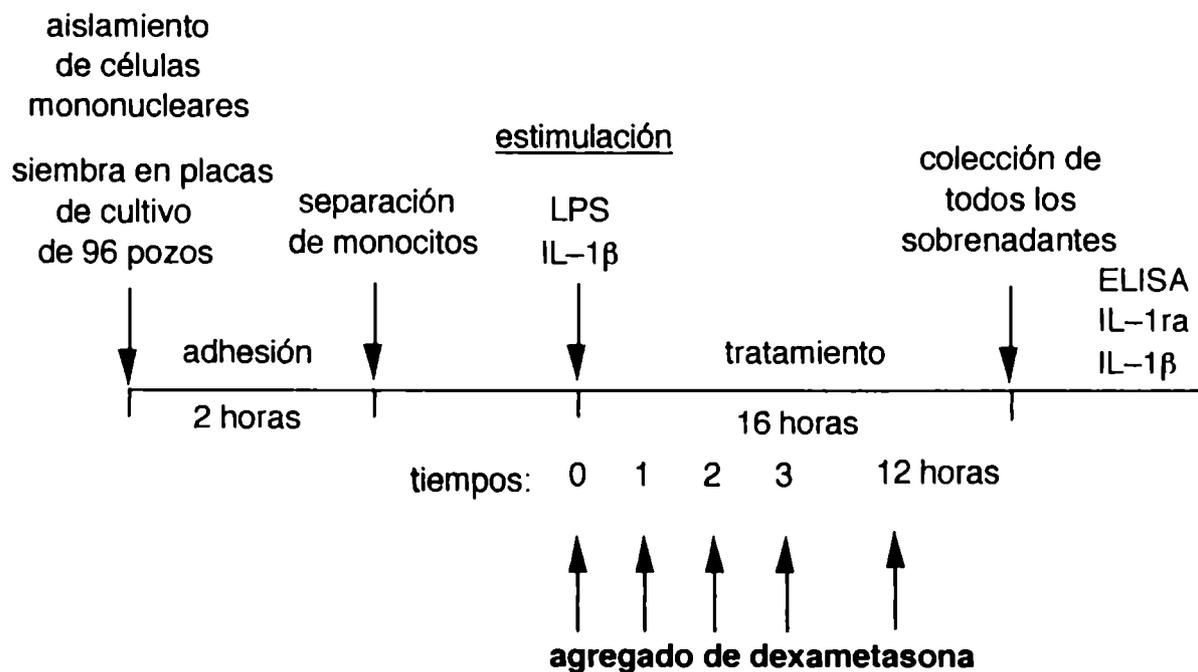
Los cultivos de monocitos fueron incubados, después de los lavados, con medio de cultivo por 30 minutos antes de realizar los tratamientos detallados en cada protocolo experimental.



**Figura 1 :** Protocolo de tratamiento de células utilizado para los experimentos de Northern blot. Los cultivos de monocitos fueron estimulados con LPS o IL-1 $\beta$  y simultáneamente se agregaron los reactivos y drogas indicados según se indica en cada experimento en la sección Resultados. El rIL-1ra para los experimentos de bloqueo de los efectos de IL-1 se agregó 30 minutos antes de la estimulación con LPS. db-cAMP, dibutilil cAMP; Ptx, toxina Pertussis.



**Figura 2:** Protocolo de tratamiento de células utilizado para los experimentos de determinación de IL-1ra e IL-1 $\beta$  por ELISA en sobrenadantes de cultivo. Los cultivos de monocitos fueron estimulados con LPS o IL-1 $\beta$  y simultáneamente se agregaron los reactivos y drogas indicados según se detalla en cada experimento en la sección Resultados. El anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  para los experimentos de bloqueo de los efectos de IL-1 $\beta$  se agregó 30 minutos antes de la estimulación con LPS.



**Figura 3 :** Protocolo de tratamiento de células utilizado para los experimentos de cinética de la inhibición de glucocorticoides sobre la secreción de IL-1ra e IL-1 $\beta$ . Los cultivos de monocitos fueron estimulados con LPS o IL-1 $\beta$  y se agregó dexametasona a distintos cultivos en los tiempos indicados. Todos los sobrenadantes fueron colectados 16 horas después de la estimulación. Se determinaron las concentraciones de IL-1ra e IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes por ELISA.

## 2. ANALISIS DE RNA

### 2.1 EXTRACCION DE RNA

La extracción de RNA se realizó por el método de tiocianato de guanidina y fenol-cloroformo para realizar Northern blots. Concluido el tiempo de tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se agregó 1 ml de solución D (tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM, sarcosyl 0.5 %) a cada well. La capa de monocitos adherentes fue homogeneizada en la solución D aspirando con pipeta. El homogenato fue transferido a tubos eppendorf conteniendo 500  $\mu$ l cada uno. A cada eppendorf, se le agregó 50  $\mu$ l de acetato de sodio 2 M, pH 4. Luego se realizó una extracción con 500  $\mu$ l de fenol y 100  $\mu$ l de cloroformo-isoamílico (49:1)

y se agitó en vortex durante 15 segundos. Las muestras se dejaron en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron durante 15 minutos a 15000 rpm a 4°C. En este paso se eliminaron las proteínas, lípidos y DNA en la fase orgánica e interfase. Se recuperó la fase acuosa conteniendo el RNA y se precipitó con un volumen de isopropanol durante una hora a -20 °C. Se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 150 µl de solución D y se reprecipitó con un volumen de isopropanol como en el paso anterior a -20 °C. Finalmente se realizó un lavado con 800 µl de etanol 75 % y se centrifugó por 10 minutos a 15000 rpm, el pellet de RNA se secó en speedback y se resuspendió en agua con DEPC.

## 2.2. CUANTIFICACION DE RNA

Se realizó una dilución 1/100 de cada muestra en agua con DEPC y se determinó su concentración por absorbancia a 260 y 280 nm. Una unidad de absorbancia indica una concentración de 40 µg/ml de RNA. El rendimiento de la extracción de RNA fue de alrededor de 10 µg de RNA cada  $2 \times 10^7$  células. La pureza de las muestras fue evaluada calculando el índice  $A_{260}/A_{280}$ . Las muestras utilizadas para Northern blot tuvieron un índice entre 1.8 y 2.

## 2.3. ELECTROFORESIS DE RNA CON GLIOXAL

El RNA diluído en agua con DEPC en una concentración de 10 µg/8 µl fue glioxilado. Cada 8 µl de RNA se agregaron 4 µl de mezcla de glioxal (127 µl de glioxal + 8 µl de buffer fosfato 1M) y 12 µl de DMSO. Se incubaron las muestras durante una hora a 50 grados, y luego se agregó buffer de siembra ( 0.25 % azul de bromofenol y 0.25 % xilene cianol en 50 % de glicerol).

Las muestras se corrieron en gel de agarosa al 1.2 %, en buffer fosfato 10 mM pH 6.5. La corrida se efectuó a 80 mA hasta que la muestra entró en el gel y los

colorantes se separaron. Luego se continuó la corrida electroforética a 150 mA hasta que el azul de bromofenol migró 3/4 partes de la longitud total del gel.

## 2.4. NORTHERN BLOT

Una vez realizada la electroferesis, el RNA fue transferido por el método de Northern blot a una membrana de nylon. La transferencia se realizó por capilaridad durante 24 hs con buffer 20 x SSC.

Las membranas transferidas se fijaron por calor a 80 °C durante 2 horas. Luego se trataron con ácido acético por 15 minutos. Posteriormente se realizó una tinción con azul de metileno por 10 minutos para visualizar el RNA total fijado sobre las membranas (acetato de sodio 0,5 M con 0.04% de azul de metileno). Se evaluó la integridad de las preparaciones de RNA observando las bandas de RNA ribosomal. También se estimaron las cantidades relativas de RNA total sembradas en cada calle para ver si se sembraron cantidades comparables en todas ellas.

## 3. PREPARACION DE SONDAS

### 3.1. TRANSFORMACION DE BACTERIAS

Las sondas de IL-1 $\beta$  humana, receptor de IL-1 tipo II y actina humana fueron sintetizadas partiendo de plásmidos obtenidos de otros investigadores (Nishida T. et al. 1987, McMahan, C.J. et al. 1991). Estos plásmidos fueron clonados en bacterias, amplificados y aislados.

Se prepararon bacterias competentes de la cepa de Escherichia coli JM105 partiendo de un cultivo de 5 ml de medio LB saturado, crecido durante la noche a 37 °C con agitación fuerte. Con este cultivo saturado se inocularon 200 ml de LB y se crecieron hasta llegar a la fase exponencial de crecimiento. Una vez alcanzada una densidad óptica de 0.5 medida a 600 nm para estimar el crecimiento del

cultivo bacteriano, éste se incubó por 10 minutos en hielo. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. El pellet bacteriano se resuspendió en 100 ml de cloruro de calcio 100 mM preenfriado en hielo. Esta suspensión de bacterias fue nuevamente centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C. El pellet fue resuspendido en 5 ml de cloruro de calcio 100 mM y se incubó en hielo por 30 minutos. La preparación de bacterias competentes fue alicuotada colocando 200 µl en tubos eppendorf estériles agregando glicerol hasta alcanzar el 15 %. En este estadio de preparación las bacterias competentes fueron guardadas a -80 °C.

Se transformaron bacterias *Escherichia coli* JM105 competentes con los plásmidos conteniendo el cDNA específico y resistencia a ampicilina. A 200 µl de la suspensión de bacterias competentes se les agregó entre 50 y 100 ng de DNA plasmídico, se incubó 30 minutos en hielo para permitir la unión del DNA plasmídico a las bacterias. Luego se realizó un shock de calor por 5 minutos a 42°C para permitir la entrada de los plásmidos en las bacterias. Posteriormente se agregaron 800 µl de medio LB sin antibiótico (10 g Triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g Cloruro de Sodio, pH 7, autoclavado) y se incubó por 1 hora a 37 °C para permitir la expresión de la resistencia a antibióticos. Luego se sembró un volúmen apropiado en placas con agar-LB y ampicilina (agar 15 g/l , ampicilina 100 µg/ml ). Las placas se cultivaron a 37 °C durante la noche.

Se verificó el crecimiento de colonias aisladas que expresan resistencia a ampicilina y, por lo tanto, incorporaron el plásmido. Se repicó una colonia y se creció durante la noche a 37°C en 5 ml de LB con ampicilina para chequear la transformación con el plásmido correcto. Una alícuota de esta preparación se congeló a -80 °C con 15 % de glicerol.

### 3.2. AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS Y CHEQUEO POR RESTRICCIÓN

El aislamiento de plásmidos se realizó mediante la lisis en medio alcalino de las bacterias y la precipitación con acetato de sodio y etanol de los plásmidos. El cultivo de 5 ml se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. El pellet se resuspendió en solución de lisis conteniendo sacarosa 20 %, 25 mM de Tris-Cl y 10 mg/ml de lisozima. Se incubó 10 minutos en hielo. Se agregaron dos volúmenes de solución conteniendo SDS 10 % 1 ml, NaOH 2 M 1 ml y 8 ml de agua. Luego se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 4.8, se incubó 15 minutos en hielo y se centrifugó 10 minutos a 15000 rpm. En este paso se eliminan los restos celulares y el DNA cromosómico. El sobrenadante conteniendo el DNA plasmídico se precipitó con dos volúmenes de etanol, 30 minutos a -20 °C. Se centrifugó 15 minutos a 4 °C. Se efectuaron dos lavados con etanol 80 %. Se evaporó el resto de sobrenadante en speedvac. El pellet resultante se resuspendió en agua.

El plásmido aislado se cuantificó por espectrofotometría. Se midió la absorbancia de una dilución 1/500 a 260 nm. Una unidad de densidad óptica corresponde a una concentración de 50 µg/ml de DNA. Luego la preparación de plásmido fue diluída hasta una concentración de 1 µg/µl.

### 3.3. ANALISIS DEL PATRON DE RESTRICCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

Una alícuota de esta preparación de 1 µg/µl de DNA plasmídico fue cortada con las enzimas de restricción apropiadas para liberar el inserto y con RNAsa A para eliminar el RNA contaminante. La concentración enzimática utilizada fue de 1 - 10 U/µg de ADN. La reacción fue llevada a cabo usando los buffers comerciales apropiados para cada enzima durante 1 hora a 37 °C. La reacción fue detenida agregando 2 µl de EDTA 500 mM. El producto de la reacción de restricción fue

analizado mediante electroforesis en minigel ( agarosa al 0.7- 1 % en buffer TBE con bromuro de etidio: 100 mM Borato, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCL, pH 8,0.). En el gel se visualizaron con luz UV los fragmentos de cDNA que migraron de acuerdo a la longitud correspondiente a cada cDNA comparando con la migración de marcadores de peso molecular.

Una vez chequeados los plásmidos de estas colonias, se repicó una colonia del segundo repique para crecer en 500 ml de LB líquido conteniendo ampicilina y realizar una preparación en gran escala de DNA plasmídico. Este cultivo fue crecido overnight a 37 °C con agitación hasta llegar a saturación. Luego se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Luego las bacterias transformadas se procesaron de acuerdo a las instrucciones para la preparación de plásmidos con el kit de Quiagen. Esta preparación consiste brevemente en la lisis alcalina y enzimática de las bacterias y la posterior purificación del plásmido a partir del lisado mediante una columna cromatográfica que une específicamente DNA plasmídico. Como resultado de este procedimiento se obtuvieron grandes cantidades de plásmido con un alto grado de pureza.

#### 3.4. AMPLIFICACION DE FRAGMENTOS POR PCR

La sonda para IL-1ra fue amplificada a partir de un fragmento de cDNA aislado por otros investigadores (Eisenberg, S.P. et al. 1990). Para la amplificación se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa con primers específicos que se unen cerca de los extremos del fragmento de DNA. A partir de 1 µg del fragmento de cDNA se realizó la reacción de PCR agregando 5 µl de primer 3' 40 µM, 5 ul de primer 5' 40 µM, 1,5 µl dNTP 25 mM, 5 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 10 µl Taq buffer, 63 µl H<sub>2</sub>O destilada, 1 µl Taq polimerasa y finalmente, 70 µl de aceite mineral.

Con esta mezcla de reacción se realizaron 30 ciclos de replicación: 4 minutos a 94 °C, 1 minuto a 50 °C y 1 minuto a 72 °C. Luego se aisló el fragmento de DNA amplificado.

### 3.5. AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA

20 µg de cada plásmido se cortaron con las enzimas de restricción necesarias para liberar el inserto completo.

Los productos de la reacción de restricción y marcadores de peso molecular del rango de 1 Kb se sembraron en geles agarosa de bajo punto de fusión al 1 ó 1.2 % en buffer TBE con bromuro de etidio. Los productos de la reacción de PCR se corrieron en geles de agarosa de bajo punto de fusión 1,2 % usando marcadores de peso molecular en el rango de 123 bp. Las muestras fueron sembradas con el agregado de buffer de siembra. La electroforesis se realizó a 80 mA hasta que el azul de bromofenol migró 2/3 de la longitud total del gel.

Una vez obtenida la separación adecuada de las bandas correspondientes a los fragmentos observándolas en transiluminador con luz UV, se cortaron del gel y se pasaron a tubos eppendorf. Los fragmentos de gel conteniendo los fragmentos de DNA fueron incubados durante 15 minutos a 65 °C para disolver la agarosa. Se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo. Para la separación del ADN de las proteínas (nucleasas, enzimas), se agregó 1 volúmen de fenol al tubo eppendorf, se lo centrifugó, se adicionó luego un volúmen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), nuevamente se lo centrifugó, para finalmente agregar 1 volúmen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Para obtener la separación de fases se centrifugó en cada caso durante 5 minutos a 12000 rpm. La fase superior fue removida y colocada en un nuevo tubo eppendorf. Luego de realizada la extracción se agregó 1/10 volúmenes de acetato de Sodio 3 M más 2,5 volúmenes de etanol absoluto. El tubo se colocó por 15 a 60 minutos a -80°C. El pellet fue luego recuperado por una centrifugación por 20 minutos a

12000 rpm. Se lo lavó con etanol al 80 % mantenido a - 20°C, se lo dejó evaporar y se lo disolvió finalmente en buffer TE autoclavado. La fase acuosa se precipitó con 1/ 10 de volúmen de acetato de sodio 3 M pH 4 y 1 volúmen de isopropanol. Se efectuaron dos lavados con etanol 80 % y el pellet resultante se secó en speedvac y se resuspendió en agua.

Una dilución 1/500 fue cuantificada por densidad óptica a 260 nm. Una unidad de densidad óptica corresponde a una concentración de 50 µg/ml de DNA.

#### 4. MARCACION DE SONDAS

##### 4.1. RANDON PRIMER EXTENSION

Fue utilizado el método de marcación "random oligonucleotide priming". Una mezcla de hexanucleótidos se hibridiza con el ADNc a ser marcado. La cadena complementaria es obtenida mediante el uso del fragmento Klenow de la polimerasa que sintetiza DNA a partir de los primers agregados incorporando los nucleótidos radioactivos en la secuencia. Los fragmentos se marcaron por random-primer extension utilizando un kit de Boehringer.

50 ng de DNA en 9 µl de agua se desnaturalizaron a 100 °C durante 10 minutos, inmediatamente después los tubos conteniendo el DNA desnaturalizado se colocaron en hielo para evitar la renaturalización. Se agregaron entonces: 2 µl de la mezcla de reacción (hexanucleótidos disueltos en buffer-Klenow 10X) , 3 µl de una solución de dNTP (0,5 M de dATP, dGTP y dTTP) y 5 µl de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (10 µCi/ml, 3000Ci/mol). La reacción se realizó por incubación de la mezcla por 60 minutos a 37°C con el previo agregado de 1 µl (2 U) del fragmento Klenow de la polimerasa.

La sonda marcada se purificó por centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos en columnas de sephadex G 50 utilizando como eluyente buffer TES (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl. pH 7.0). Se determinaron las cpm incorporadas en 1 µl

de la primera fracción (el fragmento marcado) y 1  $\mu$ l de la segunda (oligonucleótidos) en contador beta. La actividad específica del ADN complementario fue de  $2 - 4 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g ADN.

#### 4.2. TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

La sonda para IL-1 $\beta$  (Nishida, T. et al. 1987) fue marcada por transcripción *in vitro* con nucleótidos radioactivos. Se usó como molde para la transcripción DNA plasmídico conteniendo el cDNA de IL-1 $\beta$  clonado bajo el promotor viral T7 en la orientación que da como resultado un transcripto antisentido cuando se transcribe con la enzima T7 RNA polimerasa. El molde fue cortado por restricción en el sitio Hind III que lineariza el plásmido el extremo del inserto opuesto al promotor T7, de esta forma los transcriptos se sintetizan hasta llegar a ese sitio. 1  $\mu$ g de molde se incubó con buffer de transcripción, nucleótidos trifosfato, DTT, inhibidor de RNAsas, T7 RNA polimerasa (10U/ $\mu$ g ADN) y  $^{32}$ P-UTP 50  $\mu$ Ci de g- $^{32}$ P-UTP (10 $\mu$ Ci/ml, 3000Ci/mol). La reacción se realizó a 37 °C por 1 hora. Luego, se separó la sonda marcada por centrifugación en columnas de Sephadex igualmente a lo descrito para la separación de sondas marcadas por "random primer extension" pero en este caso se usaron materiales y soluciones libres de RNAsas. También se midió la incorporación de radioactividad a las dos primeras fracciones de 100  $\mu$ l eluidas de la columna. El marcado a través de la transcripción *in vitro* dio como resultado un ARN copia con una actividad específica de  $2 - 5 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g ADN.

#### 5. HIBRIDIZACIÓN

Los filtros de nitrocelulosa se prehibridizaron durante una hora con buffer de hibridización (SSPE 5 X, formamida 50 %, dehardt 5 X y DNA de esperma de salmón, 20 X SSPE: 3.6 M NaCl, 0.2 M buffer fosfato de sodio, 20 mM EDTA, 100 X

Denhardt's: 2 % Sero albúmina bovina (BSA), 2 % Ficoll 400, 2 % Polivinilpirrolidona) a la temperatura de hibridización adecuada para cada sonda. Mediante este procedimiento se bloquearon los sitios de unión inespecífica. Luego se agregó el cDNA previamente desnaturalizado hirviéndolo por 10 minutos, o cRNA marcado (10000 cpm/ cm<sup>2</sup> de superficie de nitrocelulosa) y se hibridizó durante la noche.

Posteriormente los filtros se lavaron 2 veces 15 minutos a temperatura ambiente con 2 X SSC y 0.1 % SDS, 2 veces 15 minutos a 37 °C con 0.2 X SSC y 0.1 % SDS y una vez 30 minutos a la temperatura de hibridización con 0.1 X SSC y SDS 0.1 %. Los filtros se secaron y se expusieron con placas intensificadoras en cuarto oscuro a la película autorradiográfica. La exposición fue realizada a -80 °C hasta obtener una señal apreciable.

Los filtros luego de la exposición fueron lavados para eliminar las sondas marcadas hibridizadas. Para lograr esto se incubaron 30 minutos en buffer de lavado (5mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, 0.1 % Denhardt). Luego de secar los filtros se secaron y reexpusieron brevemente para confirmar la ausencia de marca. Luego de este procedimiento los filtros fueron reusados para hibridizar con otras sondas. Una vez revelada la radiografía, se estimó el tamaño de las bandas por comparación con el ARN ribosomal y se verificó de este modo que las bandas de ARNm aparecido como señal en la radiografía fueran las correspondientes a la sonda usada.

## 6. DENSITOMETRIA

Las placas autorradiográficas resultantes de la hibridización de los Northern blots fueron analizadas densitométricamente para cuantificar la acumulación de RNA mensajero específico. El análisis se realizó en un densitómetro LKB ultroscan (LKB Instruments Inc., Uppsala, Suecia). Los datos resultantes de la hibridización con IL-1ra, IL-1 $\beta$  y el receptor de IL-1 tipo II fueron normalizados con respecto a

los datos resultantes de la hibridación con actina humana y fueron expresados como unidades densitométricas relativas.

## 7. MEDICION DE LAS PROTEINAS IL-1 $\beta$ E IL-1ra

Los cultivos de monocitos humanos periféricos también fueron utilizados para medir la presencia de IL-1ra e IL-1 $\beta$  secretado en los sobrenadantes. Esto se llevó a cabo incubando los cultivos aislados como se describió previamente en placas de 96 pozos con fondo plano por 16 horas con los estímulos de acuerdo a cada protocolo experimental. Al cabo de este tiempo, las placas de cultivo fueron centrifugadas y se colectaron los sobrenadantes de cultivo. Los sobrenadantes fueron conservados a -20 °C hasta el momento de la medición. La determinación de IL-1ra e IL-1 $\beta$  se hizo mediante la técnica de ELISA utilizando kits comerciales (R & D, Minneapolis EE.UU) específicos para estas proteínas. Se usó en cada medición una curva estándar construida con las proteínas recombinantes provistas con los kits de medición. De acuerdo a las especificaciones de los fabricantes, estos tests no presentan reacciones cruzadas entre estas u otras citoquinas (IL-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, TNF, G-CSF, GM-CSF, LIF y TGF).

## 8. ESTADISTICA

Los resultados de las determinaciones de IL-1ra e IL-1 $\beta$  por ELISA realizadas por cuadruplicado fueron procesadas mediante ANOVA de un factor en combinación con el test de Scheffè.

## D. RESULTADOS

### 1. CRH

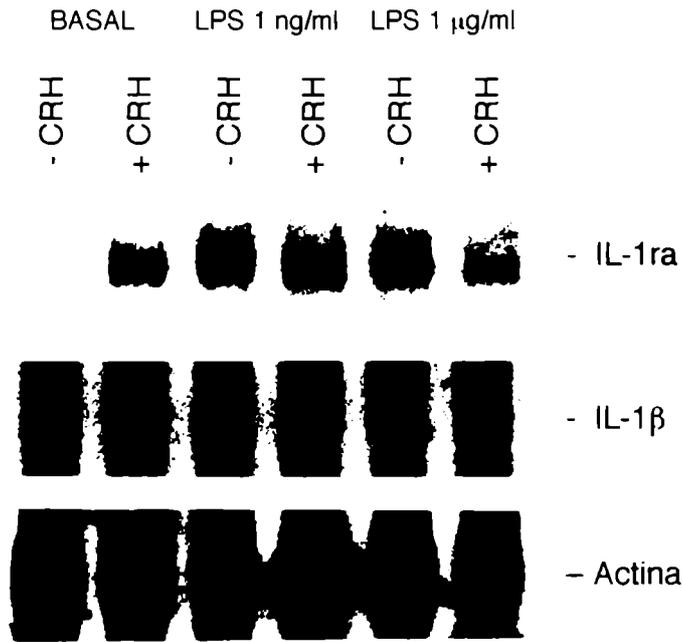
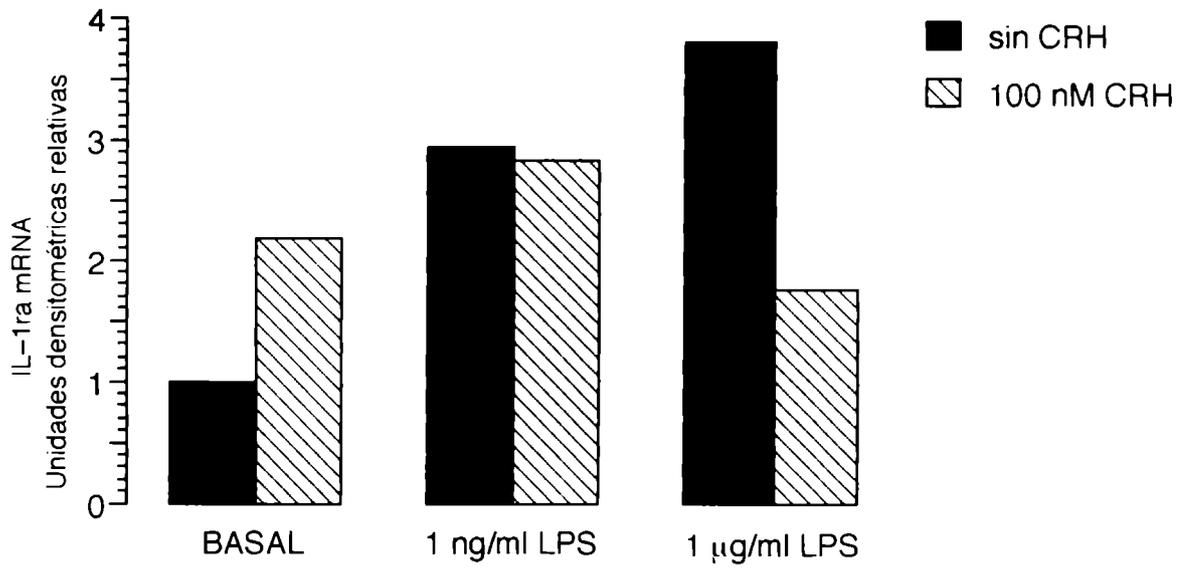
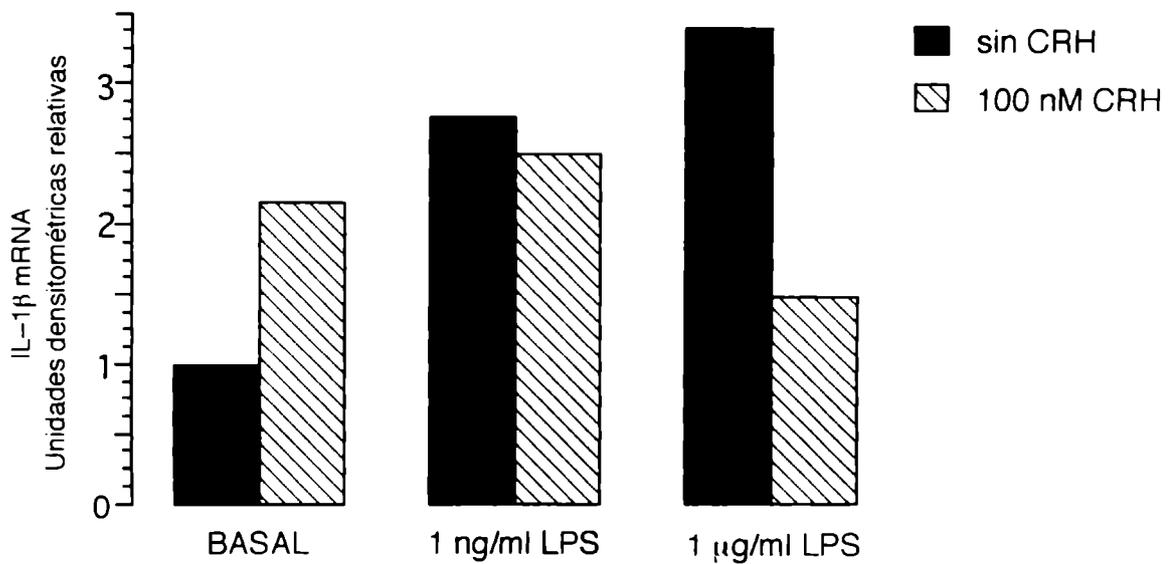
#### 1.1. EFECTOS DE CRH SOBRE LA EXPRESION DE IL-1ra

Se estudiaron los efectos de CRH sobre la expresión de IL-1ra en cultivos de monocitos humanos periféricos. Para ello las células fueron incubadas en condiciones basales o con distintas dosis de LPS para estimularlas y CRH 100 nM. La hormona y el mitógeno fueron agregados al medio de cultivo simultáneamente. Se midieron los niveles del RNA mensajero de IL-1ra por Northern blot después de tres horas de estimulación dado que en experimentos preliminares observamos que la expresión de este gen una hora después de la estimulación es muy baja para observar efectos marcados de CRH. Se observó la presencia de una única banda de 1.8 Kb correspondiente al mensajero de IL-1ra. En primer lugar se verificó la estimulación dosis dependiente de la expresión de IL-1ra por LPS. Se observó que CRH produce un efecto trifásico: en ausencia de LPS, CRH aumenta la expresión de IL-1ra, con dosis bajas de LPS (1 ng/ml) no se observan diferencias y con dosis altas de LPS (1 µg/ml), CRH inhibe fuertemente la expresión del gen (Figura 4). La dosis de 1 µg/ml de LPS si bien es alta dentro del rango de dosis usadas en experimentos in vitro, equivale a los niveles de endotoxinas encontrados en flúidos biológicos en patologías infecciosas. Estos experimentos fueron repetidos con células de cuatro individuos diferentes para verificar su reproducibilidad.

#### 1.2. EFECTOS DE CRH SOBRE LA EXPRESION DE IL-1β.

En los mismos experimentos se estudió la expresión del gen IL-1β. Se detectó por Northern blot la presencia de una única banda de 1.6 Kb correspondiente al

mRNA de IL-1 $\beta$ . Se comprobó que CRH produce sobre la expresión de IL-1 $\beta$  el mismo tipo de efecto trifásico observado en la expresión de IL-1ra. CRH tiene un efecto estimulador sobre la expresión de IL-1 en ausencia de LPS. 1 ng/ml de LPS aumenta la expresión de este gen pero no se registran cambios en combinación con CRH 100 nM. En cambio, CRH produce un efecto inhibitorio en la expresión de IL-1ra estimulada por 1  $\mu$ g/ml de LPS (Figura 4).

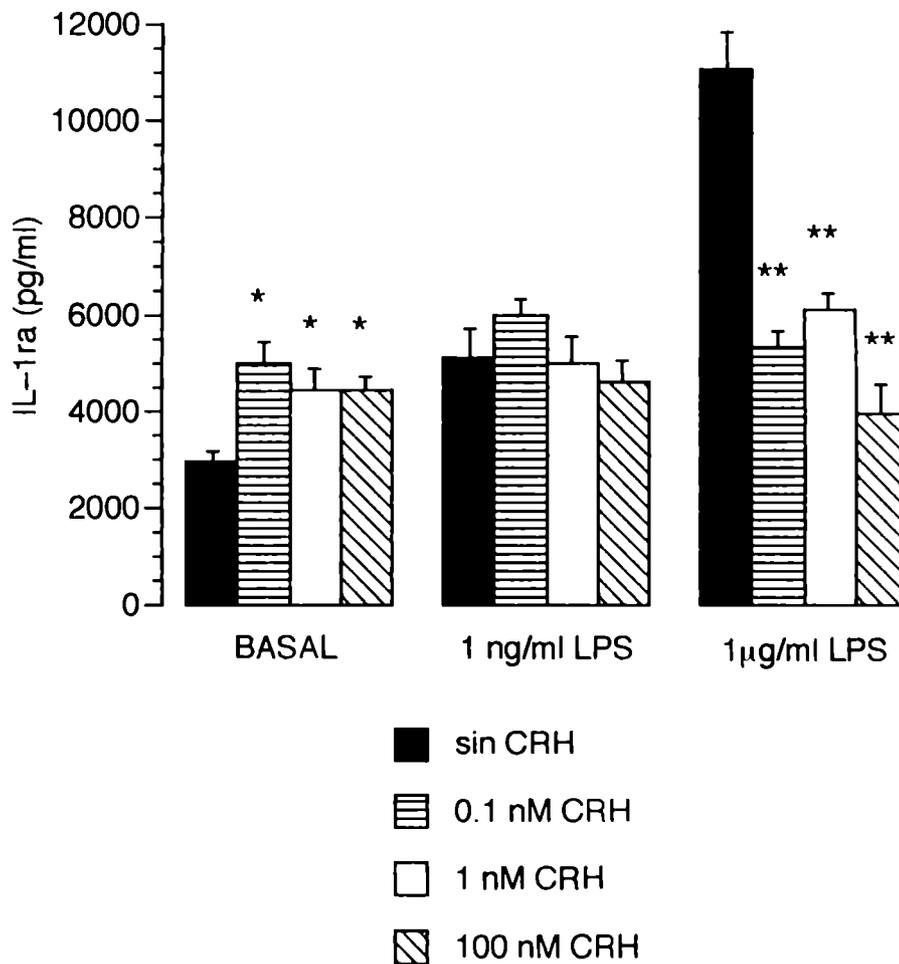
**A****B****C**

**Figura 4:** Regulación de la expresión de los RNA mensajeros de IL-1ra e IL-1β por CRH.

Monocitos humanos periféricos fueron incubados en condiciones basales o estimulados con 1 ng/ml o 1 μg/ml LPS ; simultáneamente se agregó CRH 100 nM. Tres horas después de la estimulación, se descartó el medio de cultivo y se aisló RNA total para su análisis por Northern blot (9 μg por cada calle). A, los filtros fueron hibridizados con una sonda de IL-1ra humano de 0.23 Kb marcada con <sup>32</sup>P. Se detectó una banda única de 1.8 Kb correspondiente al RNA mensajero de IL-1ra. El mismo filtro fue rehibridizado con una sonda de IL-1β humana de 0.7 Kb marcada con <sup>32</sup>P. Todos los filtros fueron rehibridizados con una sonda de actina humana de 1 Kb como control de carga. B y C, Análisis densitométrico de las autoradiografías de A realizadas mediante la estandarización de las unidades densitométricas relativas con la intensidad de la señal de actina. Resultados similares se obtuvieron en cuatro casos diferentes.

### 1.3. EFECTOS DE CRH SOBRE LA PRODUCCION DE LA PROTEINA IL-1ra.

También se determinó la producción de la proteína de IL-1ra en los sobrenadantes de cultivos de monocitos estimulados por 16 horas con diferentes dosis de LPS en combinación con CRH (Figura 5). Estos resultados muestran una completa correlación con los obtenidos por Northern blot. Es decir que se observa un ligero pero significativo aumento en la expresión de IL-1ra inducido sólo por CRH en ausencia de LPS. Con dosis bajas de LPS se estimula ligeramente la producción de IL-1ra pero no hay diferencias significativas producidas por el agregado de CRH 100 nM. En cambio, con dosis altas de LPS (1 μg/ml), CRH 100 nM inhibe fuertemente la producción de la proteína IL-1ra. Estos estudios fueron repetidos en cuatro experimentos independientes para verificar su validez estadística.



**Figura 5:** Regulación de la secreción de IL-1ra por CRH.

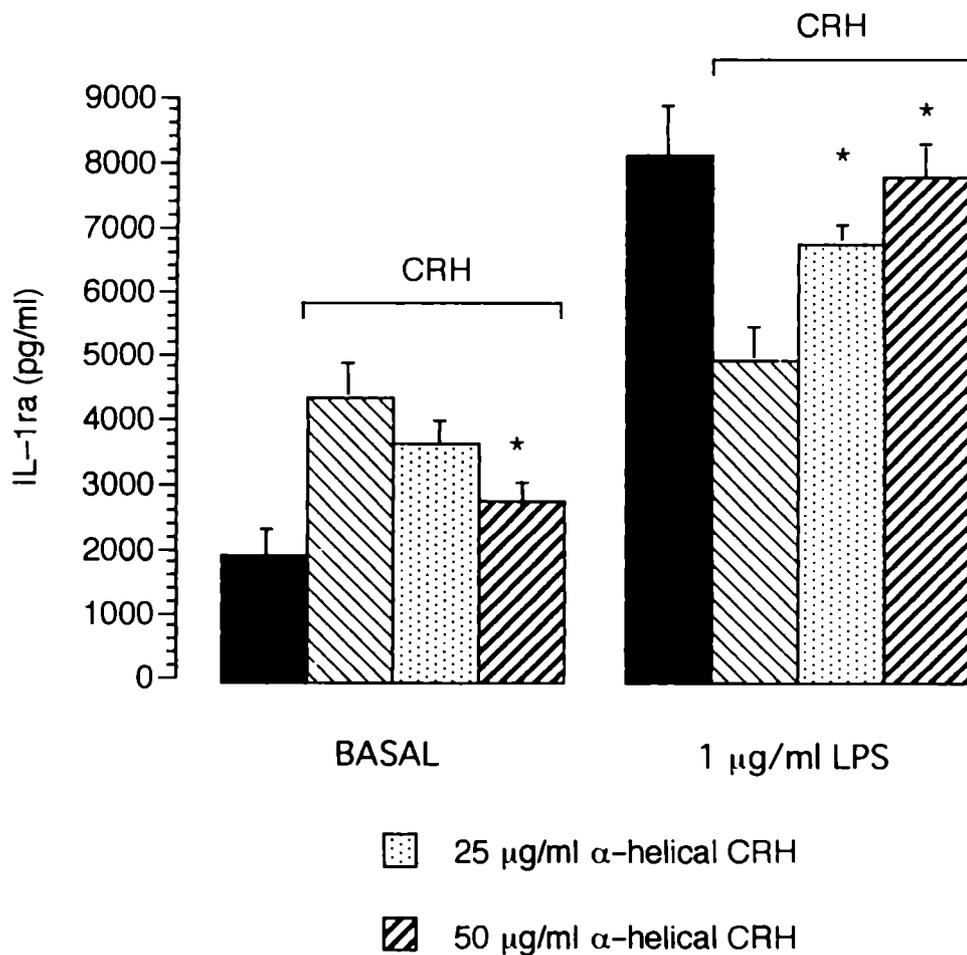
Monocitos humanos periféricos fueron incubados en condiciones basales o estimulados con 1 ng/ml o 1 µg/ml LPS ; simultáneamente se agregó CRH hasta una concentración de 0.1 nM, 1 nM o 100 nM. Después de 16 horas, se colectaron los sobrenadantes de cultivo y se determinó la concentración de IL-1ra por ELISA como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los resultados representan la media de cada condición realizada por cuadruplicado. \*,  $p < 0.01$  y \*\*,  $p < 0.001$  con respecto a los valores basales o con LPS correspondientes. Resultados similares fueron obtenidos con células de cuatro donadores diferentes.

#### 1.4. EFECTOS DEL BLOQUEO DE CRH CON EL ANTAGONISTA $\alpha$ -helical CRH.

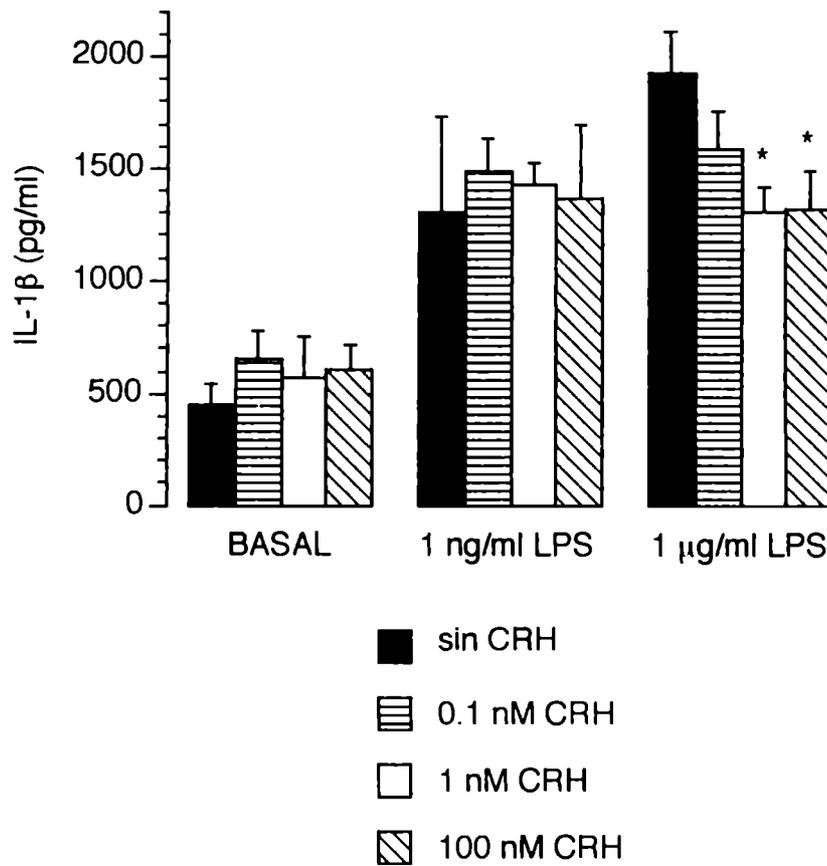
Para estudiar la especificidad de los efectos observados y la participación del receptor de CRH, bloqueamos los efectos estimulatorios e inhibitorios de CRH usando el antagonista competitivo específico  $\alpha$ -helical CRH en el rango 0 - 50  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 6). El bloqueo de CRH por parte de su antagonista se produjo en forma dosis dependiente tanto sobre la estimulación de la producción de IL-1ra por parte de CRH sola como sobre la inhibición producida por CRH en combinación con 1  $\mu\text{g/ml}$  de LPS (Figura 6). Se verificó la validez estadística del bloqueo de los efectos de CRH (Figura 6).

#### 1.5. EFECTOS DE CRH SOBRE LA PRODUCCION DE LA PROTEINA IL-1 $\beta$ .

También estudiamos los efectos de CRH y LPS sobre la secreción de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes de cultivo de monocitos humanos periféricos. Llevamos a cabo el mismo tipo de experimento que realizamos para medir la liberación de IL-1ra. Se incubaron monocitos en cultivo con distintas dosis de LPS y el agregado de CRH. En condiciones basales, CRH produjo un leve aumento en los niveles de liberación de IL-1 $\beta$  pero estas diferencias demostraron no ser estadísticamente significativas. Sin embargo el aumento de la producción de IL-1ra por CRH se repitió consistentemente en cuatro experimentos independientes. Con dosis bajas de LPS (1 ng/ml) no se observaron cambios producidos por CRH 100 nM con respecto al nivel estimulado con LPS. En presencia de dosis altas de LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ), la CRH produjo la inhibición de la liberación de IL-1 $\beta$  (Figura 7).



**Figura 6:** Reversión de los efectos de CRH sobre la secreción de IL-1ra con  $\alpha$ -helical CRH. Monocitos humanos periféricos fueron incubados en condiciones basales o estimulados con 1  $\mu$ g/ml LPS ; simultáneamente se agregó CRH hasta una concentración de 100 nM y  $\alpha$ -helical CRH en las concentraciones indicadas. Todos los reactivos fueron agregados simultáneamente y los sobrenadantes fueron colectados a las 16 horas para la determinación de IL-1ra por ELISA como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los resultados representan la media de cada condición realizada por cuadruplicado. \*,  $p < 0.01$  con respecto a los valores de los cultivos tratados con CRH sin su antagonista. Resultados similares fueron obtenidos con células de tres donadores diferentes.



**Figura 7:** Secreción de IL-1 $\beta$  por monocitos incubados con CRH.

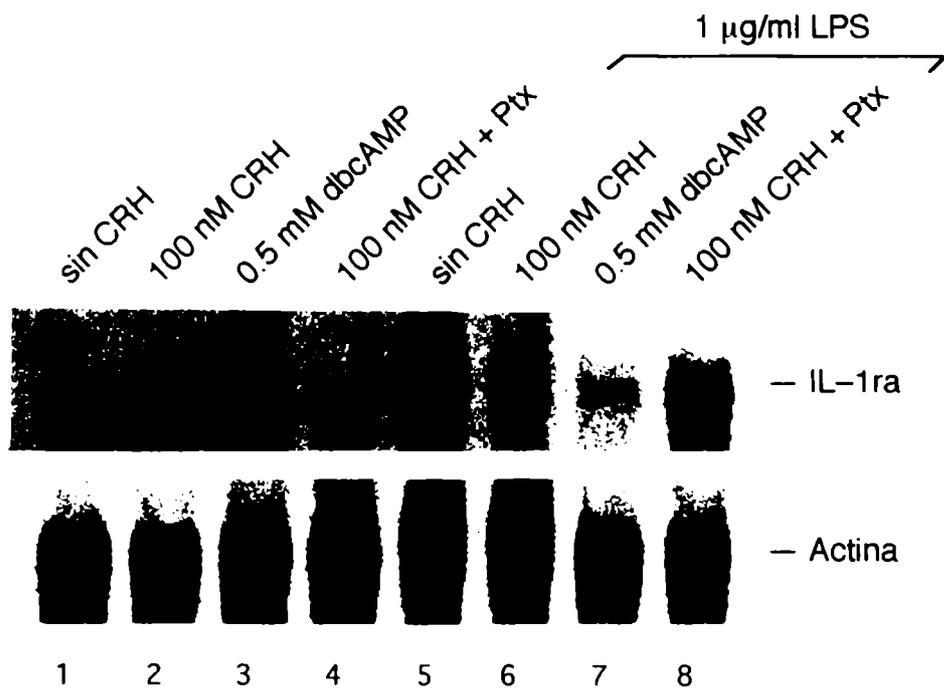
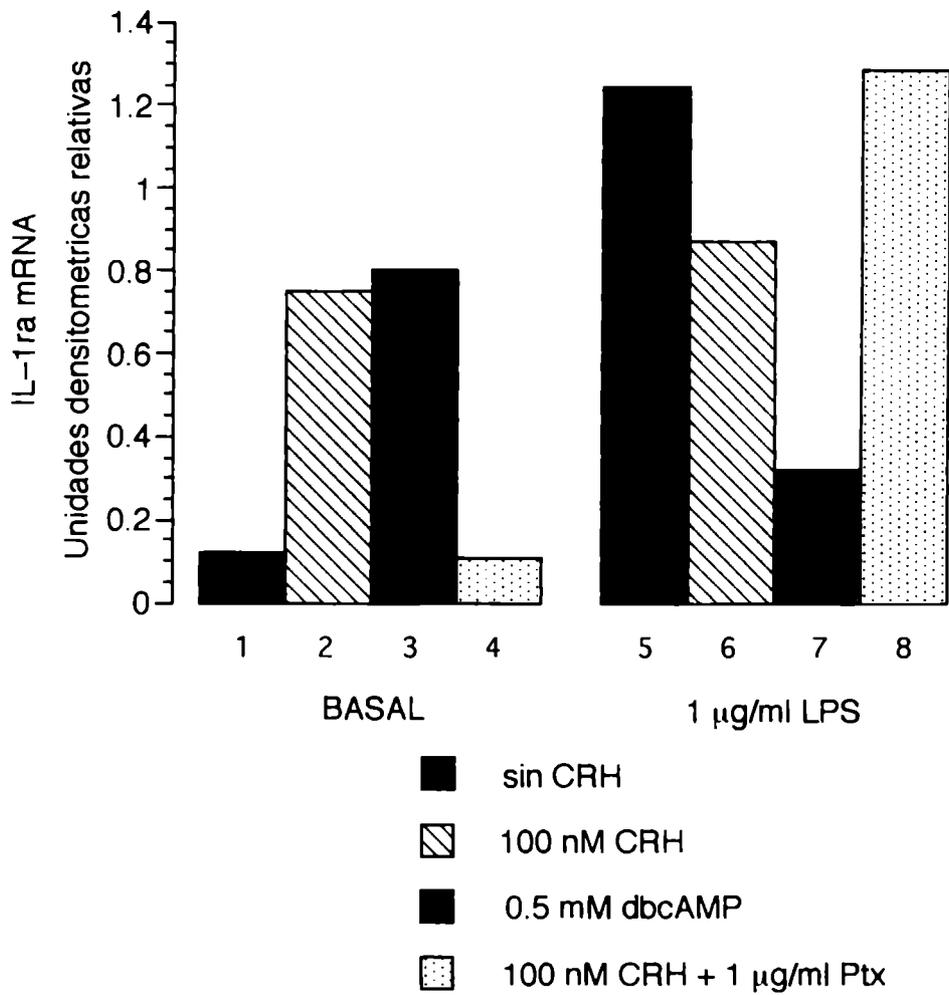
Monocitos humanos periféricos fueron incubados en condiciones basales o estimulados con 1 ng/ml o 1  $\mu$ g/ml LPS ; simultáneamente se agregó CRH hasta una concentración de 0.1 nM, 1 nM o 100 nM. Después de 16 horas, se colectaron los sobrenadantes de cultivo y se determinó la concentración de IL-1 $\beta$  por ELISA como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los resultados representan la media de cada condición realizada por cuadruplicado. \*,  $p < 0.01$  con respecto a los valores de 1  $\mu$ g/ml LPS correspondientes. Resultados similares fueron obtenidos con células de cuatro donadores diferentes.

#### 1.6. EFECTOS DE LA VARIACION INTRACELULAR DE cAMP SOBRE LA EXPRESION DE IL-1ra.

Dado que la CRH transduce su señal a través de un receptor de membrana presente en los monocitos que desencadena un incremento intracelular de cAMP, tratamos de imitar los efectos de CRH sobre la expresión del RNA mensajero de IL-1ra con dibutilil cAMP (dbcAMP) y de revertirlos con toxina Pertussis (Figura 8). Los resultados de estos experimentos indican que el cAMP exógeno (0.5 mM dibutilil cAMP) estimula la expresión de IL-1ra cuando los monocitos se cultivaron en condiciones basales al igual que lo hace CRH. Por otra parte, el cAMP inhibe la expresión de IL-1ra estimulada por 1  $\mu$ g/ml de LPS imitando el efecto de CRH (Figura 8). La toxina Pertussis 1  $\mu$ g/ml revierte totalmente la estimulación de la expresión de IL-1ra producida por CRH sola y revierte la inhibición producida por CRH sobre la expresión de este gen estimulada por 1  $\mu$ g/ml de LPS (Figura 8).

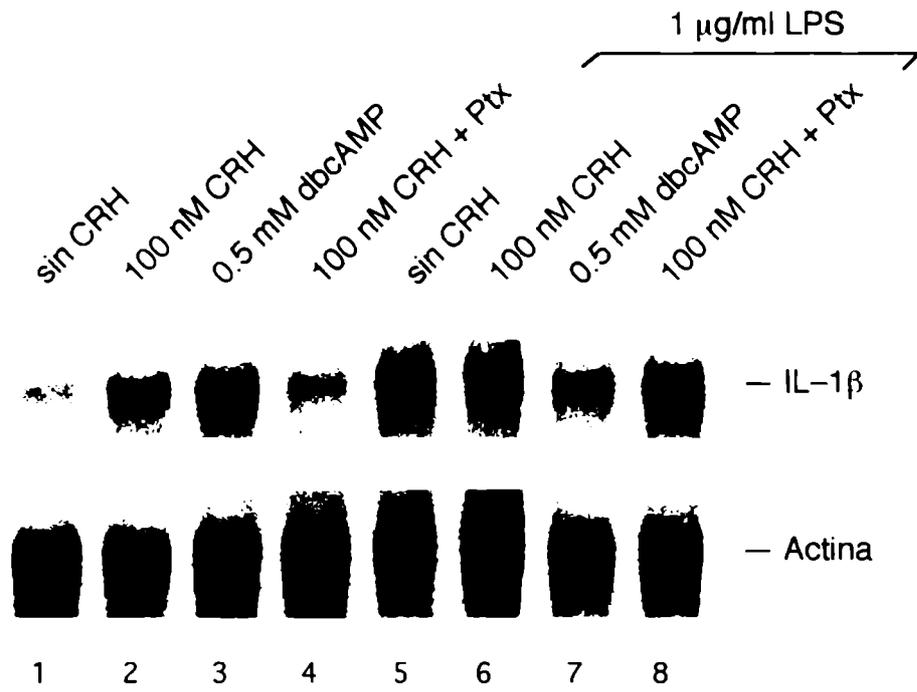
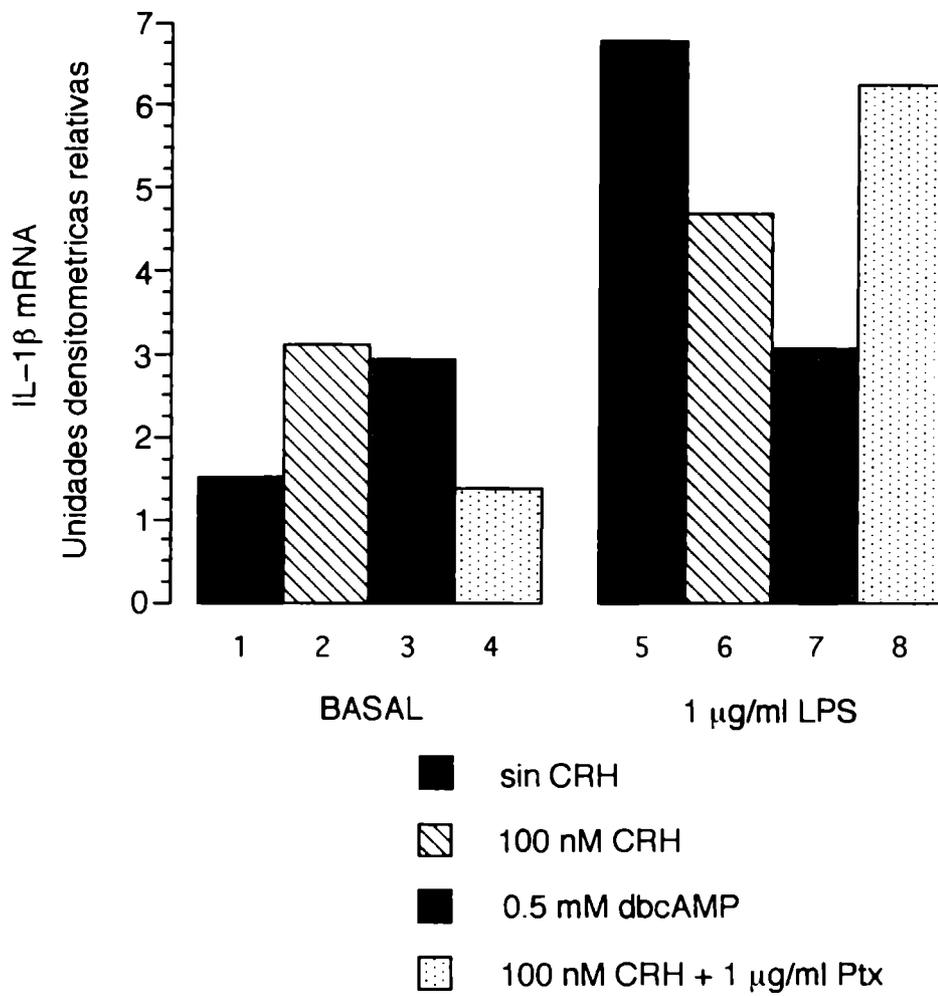
#### 1.7. EFECTOS DE LA VARIACION INTRACELULAR DE cAMP SOBRE LA EXPRESION DE IL-1 $\beta$ .

También estudiamos la participación del cAMP en los efectos de CRH sobre la expresión del gen de IL-1 $\beta$ . Para ello cultivamos monocitos humanos periféricos con CRH y dbcAMP para imitar los efectos de CRH, o bien LPS, CRH y toxina Pertussis para inhibir el aumento intracelular de cAMP producido por CRH. Se observó el mismo patrón de regulación que en el caso del mensajero de IL-1ra. El cAMP exógeno puede reproducir los efectos estimulatorios del agregado de CRH en condiciones basales y la inhibición en presencia de 1  $\mu$ g/ml LPS. La toxina Pertussis bloquea ambos efectos de CRH sobre la expresión de IL-1 $\beta$  (Figura 9).

**A****B**

**Figura 8:** Efectos de dibutilil AMP cíclico y toxina Pertussis sobre la expresión del RNA mensajero de IL-1ra estimulada por LPS y CRH.

Monocitos humanos periféricos fueron estimulados con LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ , CRH 100 nM, dibutilil AMP cíclico (db-cAMP) 0.5 mM, o toxina Pertussis (Ptx) 1  $\mu\text{g/ml}$ . Después de tres horas, se aisló RNA total para su análisis por Northern blot (10  $\mu\text{g}$  en cada calle). A, los filtros fueron hibridizados con una sonda de IL-1ra humano de 0.23 Kb marcada con  $^{32}\text{P}$ . Todos los filtros fueron rehibridizados con una sonda de actina humana de 1 Kb como control de carga. B , análisis densitométrico de la autoradiografía de A realizada mediante la estandarización de las unidades densitométricas relativas con la intensidad de la señal de actina. Resultados similares se obtuvieron en tres casos diferentes.

**A****B**

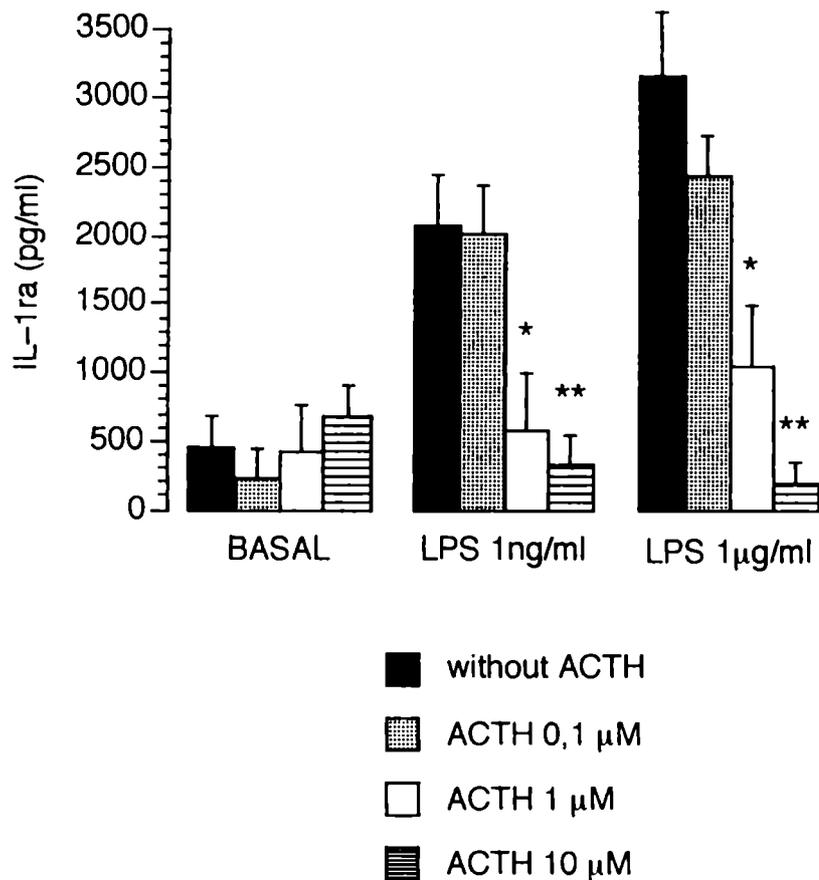
**Figura 9:** Efectos de dibutilil AMP cíclico y toxina Pertussis sobre la expresión de del RNA mensajero de IL-1 $\beta$  estimulada por LPS y CRH.

Monocitos humanos periféricos fueron estimulados con LPS 1  $\mu$ g/ml, CRH 100 nM, dibutilil AMP cíclico (db-cAMP) 0.5 mM, o toxina Pertussis (Ptx) 1  $\mu$ g/ml. Después de tres horas, se aisló RNA total para su análisis por Northern blot (10  $\mu$ g en cada calle). A, los filtros fueron hibridizados con una sonda de IL-1 $\beta$  humano de 0.7 Kb marcada con  $^{32}$ P. Todos los filtros fueron rehibridizados con una sonda de actina humana de 1 Kb como control de carga. B , análisis densitométrico de la autoradiografía de A realizada mediante la estandarización de las unidades densitométricas relativas con la intensidad de la señal de actina. Resultados similares se obtuvieron en tres casos diferentes.

## 2. ACTH

### 2.1. EFECTOS DE ACTH SOBRE LA PRODUCCION DE LA PROTEINA IL-1ra.

También estudiamos los efectos de ACTH sobre la liberación de IL-1ra al sobrenadante de cultivo de monocitos humanos periféricos. Los cultivos fueron incubados en condiciones basales o activados con 1ng/ml ó 1  $\mu$ g/ml de LPS. Al mismo tiempo de la estimulación con LPS, se agregó ACTH en concentraciones 0.1, 1 ó 10 nM. Se detectó la secreción de IL-1ra a las 16 horas de estimulación por ELISA. En condiciones basales el agregado de ACTH no produjo efectos significativos sobre la producción de IL-1ra. En cambio con LPS en dosis bajas o altas ACTH produjo una marcada inhibición dosis dependiente de la producción de esta proteína (Figura 10).



**Figura 10:** Efectos de ACTH sobre la secreción de IL-1ra.

Monocitos humanos periféricos fueron incubados en condiciones basales o estimulados con 1 ng/ml o 1 µg/ml LPS ; simultáneamente se agregó ACTH hasta una concentración de 0.1µM, 1 µM o 10 µM. Después de 16 horas, se colectaron los sobrenadantes de cultivo y se determinó la concentración de IL-1ra por ELISA como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los resultados representan la media de cada condición realizada por cuadruplicado. \*,  $p < 0.01$  y \*\*,  $p < 0.001$  con respecto a los valores de LPS correspondientes. Resultados similares fueron obtenidos con células de cuatro dadores diferentes.

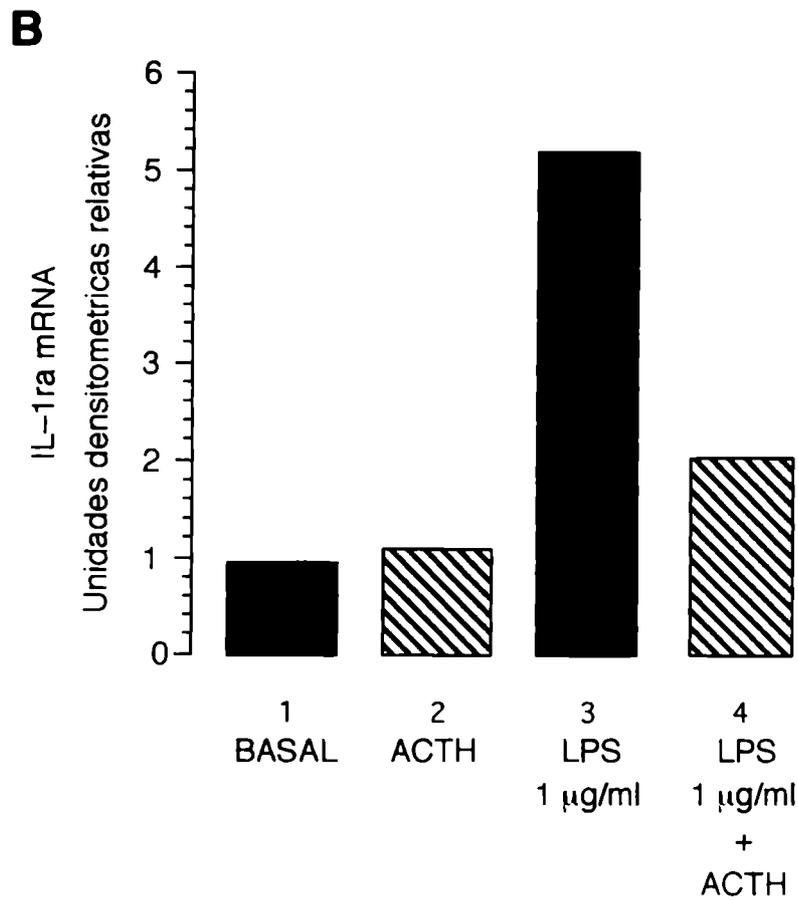
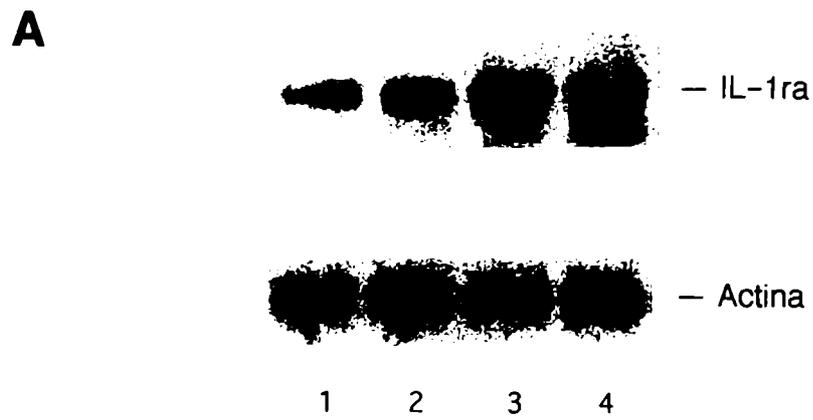
## 2.2. EFECTOS DE ACTH SOBRE LA EXPRESION DE IL-1ra

Estudiamos los efectos de ACTH sobre la expresión del mensajero de IL-1ra en monocitos humanos en cultivo. Los cultivos fueron incubados en condiciones basales o estimulados con 1 µg/ml de LPS. Simultáneamente se agregó ACTH 10

nM. A las tres horas de estimulación se detectó el RNA mensajero de IL-1ra por Northern blot. Se observó que en condiciones basales el agregado de ACTH no modifica la expresión de este gen. En cambio, cuando los monocitos fueron estimulados con LPS, ACTH inhibió la acumulación de RNA mensajero de IL-1ra (Figura 11). Resultados similares fueron obtenidos en tres experimentos independientes.

### 2.3. EFECTOS DE ACTH SOBRE LA EXPRESION DE IL-1 $\beta$

Estudiamos también los efectos de ACTH sobre la expresión del gen de IL-1 $\beta$  a nivel de acumulación de RNA mensajero en monocitos. Los cultivos de monocitos humanos fueron estimulados con LPS 1  $\mu$ g/ml en combinación con ACTH 10 nM. No se detectaron diferencias en la expresión de este gen en condiciones basales o con el agregado de ACTH. Sin embargo, ACTH inhibió la expresión de IL-1 $\beta$  en los monocitos estimulados con LPS (Figura 12).

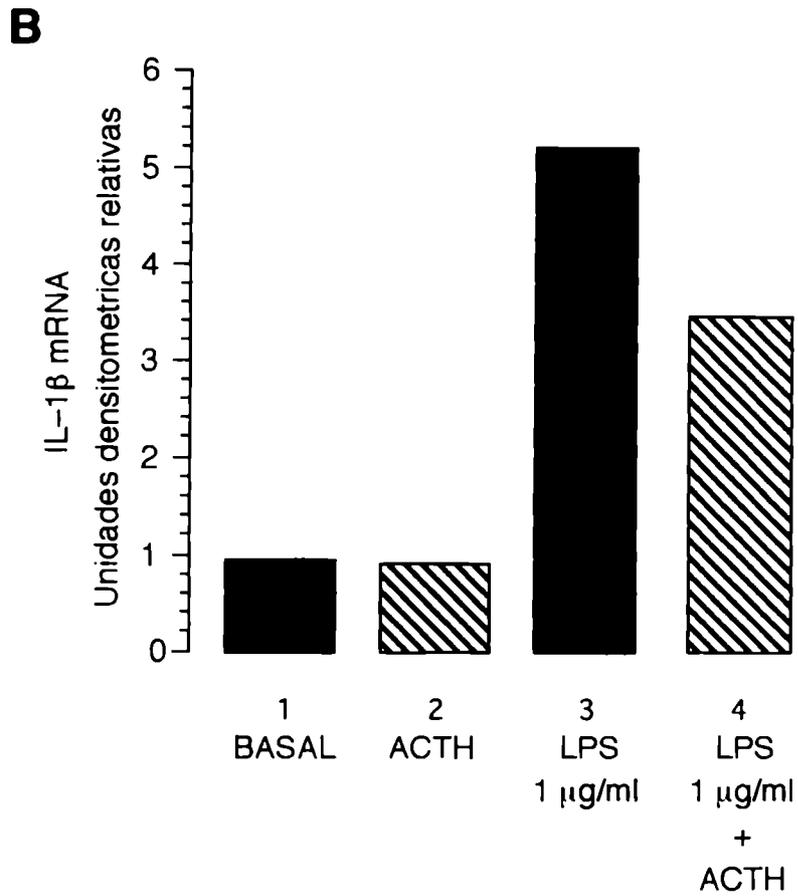


**Figura 11:** Regulación de la expresión del RNA mensajero de IL-1ra por ACTH.

Monocitos humanos periféricos fueron incubados en condiciones basales o estimulados con 1 µg/ml LPS ; simultáneamente se agregó ACTH 10 µM. Tres horas después de la estimulación, se descartó el medio de cultivo y se aisló RNA total para su análisis por Northern blot (10 µg por cada calle).

A. los filtros fueron hibridizados con una sonda de IL-1ra humano de 0.23 Kb

marcada con  $^{32}\text{P}$ . Los filtros fueron rehibridizados con una sonda de actina humana de 1 Kb como control de carga. B, Análisis densitométrico de la autorradiografía de A realizada mediante la estandarización de las unidades densitométricas relativas con la intensidad de la señal de actina. Resultados similares se obtuvieron en tres casos diferentes.



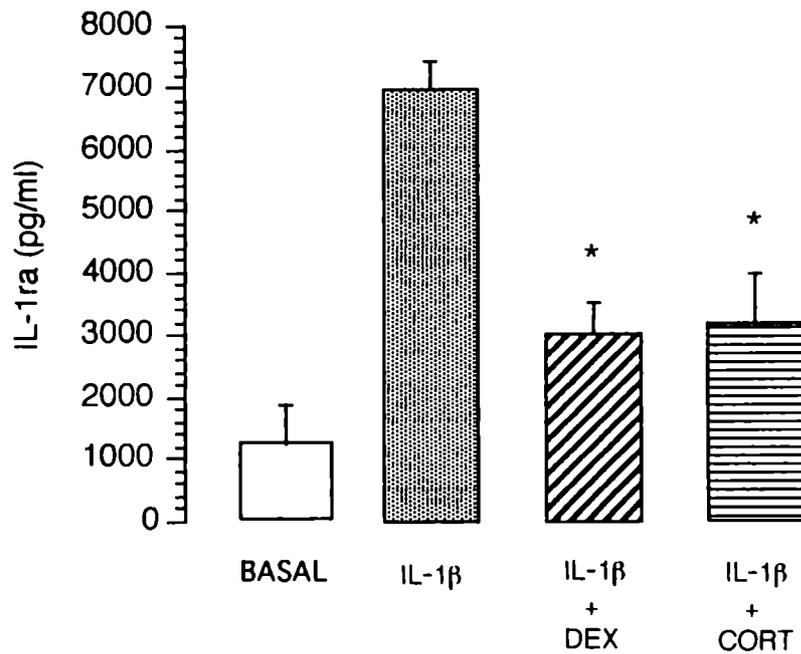
**Figura 12:** Regulación de la expresión del RNA mensajero de IL-1 $\beta$  por ACTH.

Monocitos humanos periféricos fueron incubados en condiciones basales o estimulados con 1  $\mu$ g/ml LPS ; simultáneamente se agregó ACTH 10  $\mu$ M. Tres horas después de la estimulación, se descartó el medio de cultivo y se aisló RNA total para su análisis por Northern blot (10  $\mu$ g por cada calle). A, los filtros fueron hibridizados con una sonda de IL-1 $\beta$  humano de 0.7 Kb marcada con  $^{32}$ P. Los filtros fueron rehibridizados con una sonda de actina humana de 1 Kb como control de carga. B, Análisis densitométrico de la autoradiografía de A realizada mediante la estandarización de las unidades densitométricas relativas con la intensidad de la señal de actina. Resultados similares se obtuvieron en tres casos diferentes.

### 3. GLUCOCORTICOIDES

#### 3.1. EFECTOS DE IL-1 Y GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA PRODUCCION DE IL-1ra

Se estudiaron los mecanismos de acción de los glucocorticoides sobre la expresión de IL-1ra en monocitos estimulados con LPS. Para ello se trataron cultivos primarios de monocitos humanos periféricos con 100 U/ml IL-1 $\beta$  recombinante humana durante 16 horas para ver si esta citoquina puede inducir la expresión de IL-1ra. Se observó que IL-1 $\beta$  es capaz de estimular aproximadamente siete veces la secreción de IL-1ra (Figura 13). El efecto estimulador de IL-1 fue inhibido significativamente con dexametasona 100 nM y cortisol 100 nM (Figura 13).



**Figura 13:** Efectos de los glucocorticoides sobre la secreción de IL-1ra inducida por IL-1 $\beta$ .

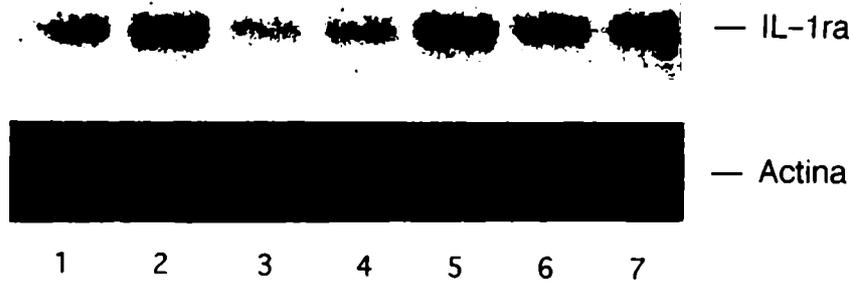
Monocitos humanos periféricos fueron estimulados con 100 U/ml IL-1 $\beta$  en combinación con dexametasona (DEX) 100 nM o cortisol (CORT) 100 nM. Después de 16 horas, se colectaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-1ra por ELISA como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los resultados representan la media de los cuadruplicados de cada condición. \*,  $p < 0.001$ , con respecto a los valores estimulados con IL-1 $\beta$ . Resultados similares se obtuvieron con células de cuatro donadores diferentes.

### 3.2. EFECTOS DE IL-1 Y GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA EXPRESION DE IL-1ra

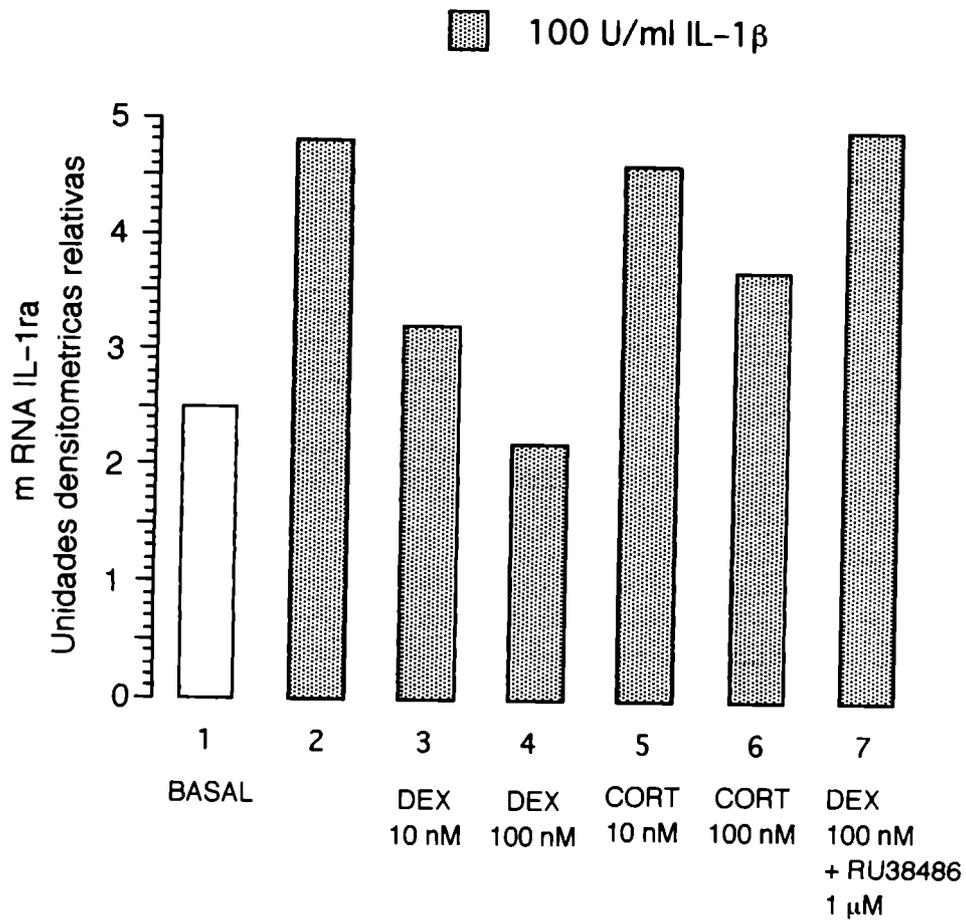
También se estudió el efecto de IL-1 sobre la acumulación de mRNA de IL-1ra. Para esto se incubaron monocitos humanos periféricos con 100 U/ml de IL-1 $\beta$  por tres horas y se detectó la expresión de IL-1ra por Northern blot. Se observó que la IL-1 estimula la acumulación del RNA mensajero de IL-1ra (Figura 14). También se observó que dexametasona produce una inhibición dosis dependiente en el

rango 10 - 100 nM sobre la expresión de este gen. En cambio los efectos inhibitorios del glucocorticoide endógeno cortisol son menos marcados, sólo se observó inhibición con la dosis de 100 nM. Para demostrar la especificidad de los efectos inhibitorios de la dexametasona y la mediación del receptor de glucocorticoides se revirtió el efecto inhibitorio de dexametasona 100 nM sobre la expresión del RNA mensajero de IL-1ra usando el antagonista específico del receptor de glucocorticoides RU 38486 (Figura 14). Por lo tanto, se observa el mismo patrón de regulación de IL-1 y glucocorticoides sobre la expresión de IL-1ra a nivel de acumulación de RNA mensajero y secreción de proteína, aunque el efecto del cortisol sobre la expresión del mRNA de IL-1ra sólo se registra con la dosis más alta.

**A**



**B**



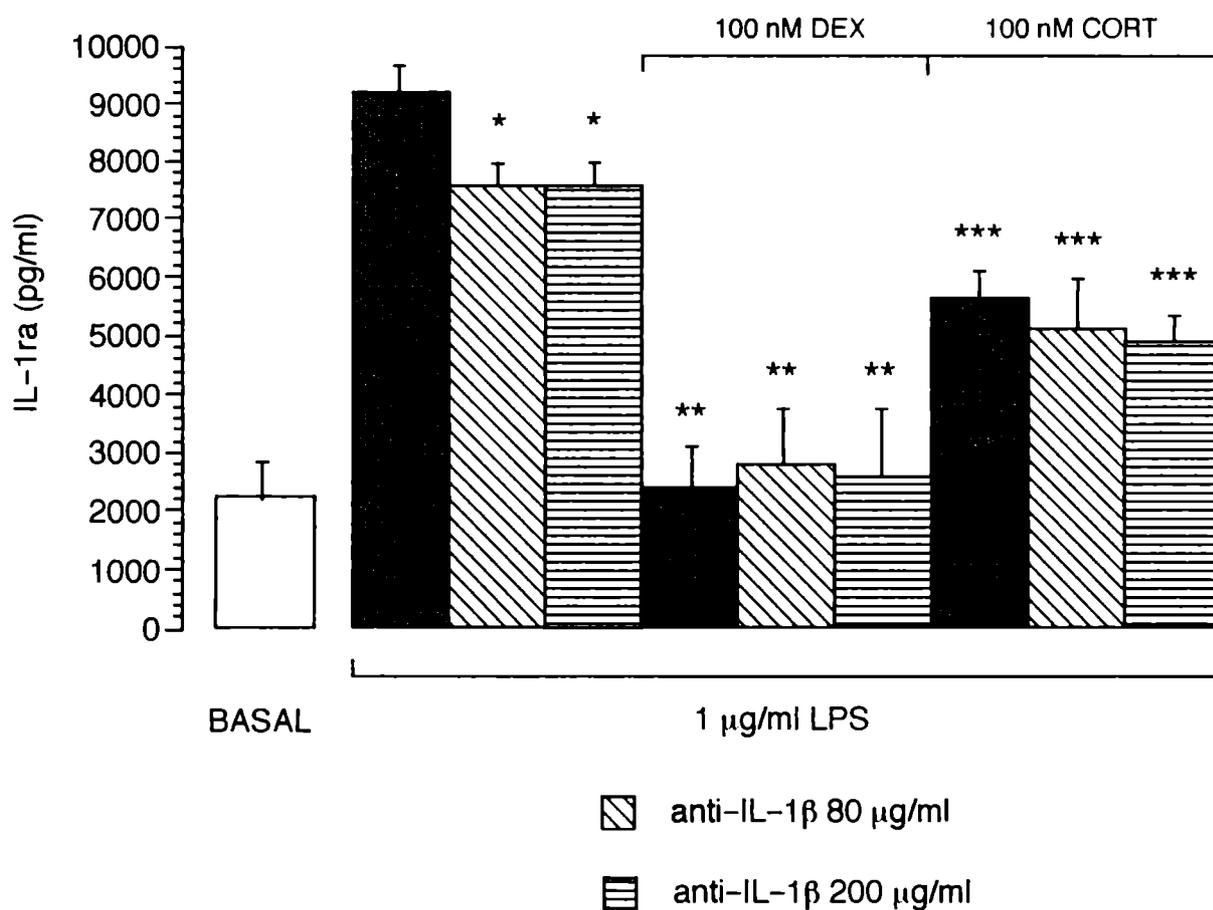
**Figura 14:** Efectos de los glucocorticoides sobre la expresión del RNA mensajero de IL-1ra inducido por IL-1 $\beta$ .

Monocitos humanos periféricos fueron incubados con 100 U/ml IL-1 $\beta$  en combinación con 10 nM o 100 nM dexametasona (DEX), 10 nM o 100 nM cortisol (CORT) y 1  $\mu$ M RU 38486. Tres horas después de la estimulación, se aisló RNA total para su análisis por Northern blot (10 mg por calle). A, los filtros fueron hibridizados con una sonda de IL-1ra humano de 0.23 Kb marcada con <sup>32</sup>P. Todos los filtros fueron rehibridizados con una sonda de actina humana de 1 Kb como control de carga. B, análisis densitométrico de la autoradiografía de A realizada mediante la estandarización de las unidades densitométricas relativas con la intensidad de la señal de actina. Resultados similares se obtuvieron en cuatro casos diferentes.

### 3.3. PARTICIPACION DE LA IL-1 EN LA PRODUCCION DE LA PROTEINA IL-1ra INDUCIDA POR LPS Y EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES

Dado que LPS estimula la expresión de IL-1 y de IL-1ra y a su vez IL-1 puede estimular su propia expresión y la de IL-1ra, LPS podría activar la expresión de IL-1ra en forma directa o mediada por un incremento de IL-1. Por lo tanto los efectos inhibitorios de los glucocorticoides que observamos en la expresión de IL-1ra podrían ser debidos a la ya conocida inhibición por glucocorticoides de IL-1. Para estudiar este problema, bloqueamos los efectos de la IL-1 $\beta$  inducida por LPS para observar los efectos directos de LPS sobre la producción de IL-1ra. Cultivos de monocitos humanos periféricos fueron estimulados con 1  $\mu$ g/ml de LPS y paralelamente se bloquearon los efectos de IL-1 $\beta$  con 80 ó 200  $\mu$ g/ml de anti-IL-1 $\beta$ . Después de 16 horas se colectaron los sobrenadantes y se midió IL-1ra por ELISA. Se observó que el aumento de la producción de IL-1ra producido por el LPS es parcialmente pero significativamente inhibido por el anticuerpo demostrando que existe un efecto de LPS no mediado por IL-1 $\beta$  (Figura 15). No se observaron diferencias significativas entre las dos dosis de anticuerpo usadas, lo cual sugiere que aún la dosis más baja bloquea completamente los efectos de

IL-1 $\beta$ . Cuando se trataron los monocitos con dexametasona en combinación con el anticuerpo anti-IL-1 se inhibió completamente la producción de IL-1ra y no se registraron diferencias significativas entre la inhibición producida por el glucocorticoide solo o en combinación con el anticuerpo (Figura 15). El cortisol también inhibió la expresión de IL-1ra en igual medida solo o en combinación con el anticuerpo (Figura 15). Este hecho sugiere que la acción inhibitoria de los glucocorticoides podría tener lugar directamente sobre la expresión de IL-1ra.



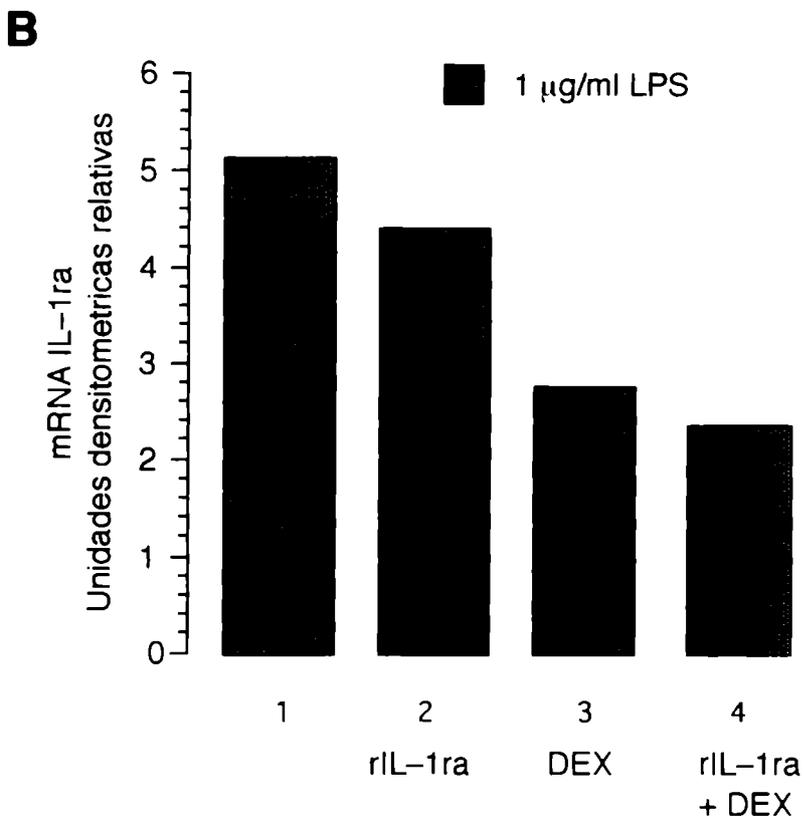
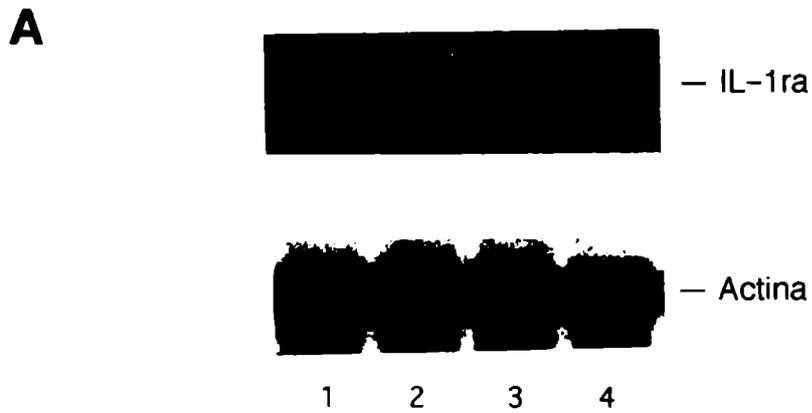
**Figura 15:** Efectos del anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  y los glucocorticoides sobre la secreción de IL-1ra estimulada por LPS.

Monocitos humanos periféricos fueron estimulados con 1 µg/ml LPS con la adición simultánea de dexametasona (DEX) 100 nM o cortisol (CORT) 100 nM en presencia de anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  80 µg/ml o 200 µg/ml según se indica. Después de 16 horas, se colectaron los

sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-1ra por ELISA como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los resultados representan la media de los cuadruplicados de cada condición. \*,  $p < 0.001$ , con respecto a los valores estimulados con LPS; \*\*,  $p < 0.001$  con respecto a LPS y a LPS + anticuerpo; \*\*\*,  $p < 0.01$  con respecto a LPS y a LPS + anticuerpo. Las diferencias entre los valores obtenidos con los glucocorticoides solos o en combinación con ambas dosis de anticuerpo no son significativas. Resultados similares se obtuvieron con células de cuatro donadores diferentes.

#### 3.4. PARTICIPACION DE LA IL-1 EN LA EXPRESION DE IL-1ra INDUCIDO POR LPS Y EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES

Para estudiar los la participación de IL-1 en los efectos de LPS sobre la expresión del RNA mensajero de IL-1ra se bloquearon los efectos de la IL-1 endógena producida por los monocitos en respuesta al LPS usando IL-1ra recombinante humano. Los cultivos de monocitos se estimularon con 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS y simultáneamente se agregaron rIL-1ra 50 ng/ml o dexametasona 100 nM. A las tres horas de estimulación se estudió la expresión de IL-1ra por Northern blot. Se observó que el LPS estimuló la expresión del RNA mensajero de IL-1ra y el rIL-1ra inhibió parcialmente esta estimulación (Figura 16). La dexametasona produjo una inhibición mayor sobre la expresión de este gen sola o en combinación con rIL-1ra (Figura 16).



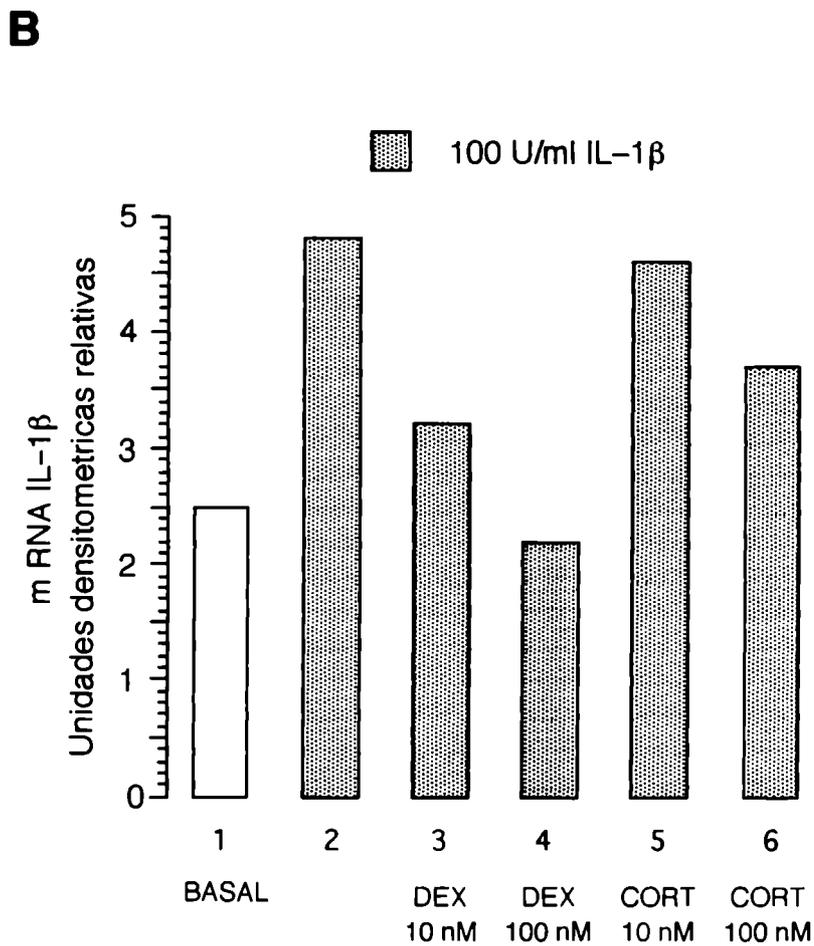
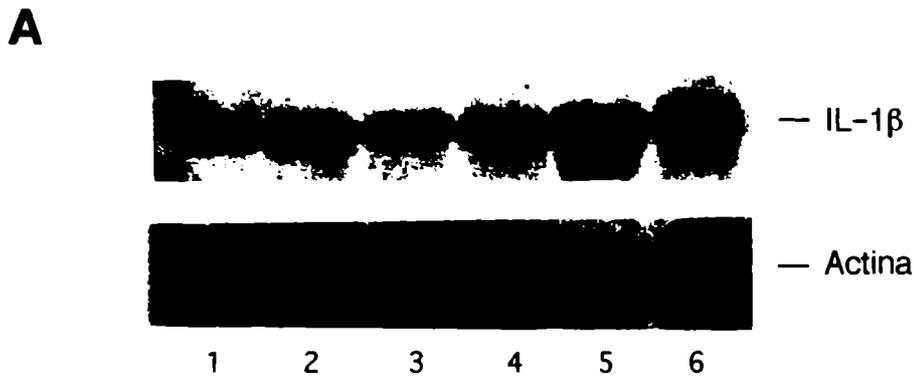
**Figura 16.** Efectos de IL-1ra recombinante y glucocorticoides en la expresión del RNA mensajero de IL-1ra.

Monocitos humanos periféricos fueron estimulados con LPS  $1\mu\text{g/ml}$  e incubados con  $100\text{ nM}$  dexametasona (DEX) en combinación con IL-1ra recombinante (rIL-1ra)  $50\text{ ng/ml}$ . Tres horas después de la estimulación, se aisló RNA total para su análisis por Northern blot ( $10\mu\text{g}$  por calle). A, los filtros fueron hibridizados con una sonda de IL-1ra humano de  $0.23\text{ Kb}$  marcada

con  $^{32}\text{P}$ . Todos los filtros fueron rehibridizados con una sonda de actina humana de 1 Kb como control de carga. B , análisis densitométrico de la autoradiografía de A realizada mediante la estandarización de las unidades densitométricas relativas con la intensidad de la señal de actina. Resultados similares se obtuvieron con células de tres donadores diferentes.

### 3.5. EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA INDUCCION AUTOREGULATORIA DE IL-1

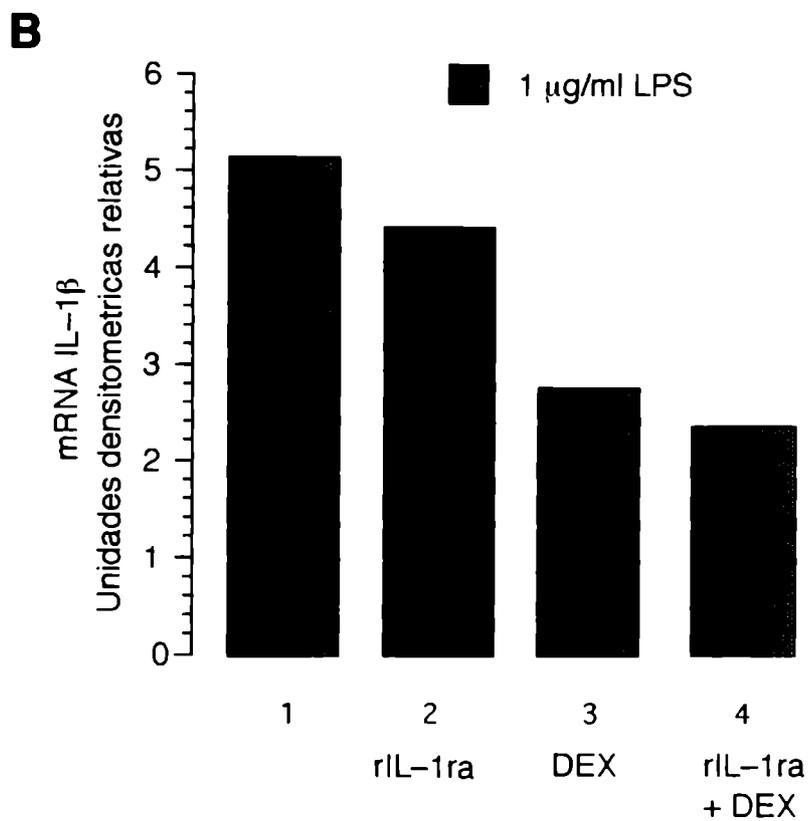
Ya que existe un loop autorregulatorio mediante el cual la IL-1 estimula su propia síntesis (Dinarello, C.A. et al. 1987, Warner, S.J.C. et al. 1987), verificamos la existencia de este loop a nivel de la acumulación de RNA mensajero de IL-1 y estudiamos los efectos de los glucocorticoides en este circuito. Este loop autorregulatorio ya había sido estudiado a nivel de la secreción de proteína por otros autores (Dinarello, C.A. et al. 1987, Warner, S.J.C. et al. 1987). Estudiamos la expresión del gen de IL-1 $\beta$  a nivel de acumulación de RNA mensajero por Northern blot de RNA total proveniente de monocitos humanos periféricos. Los cultivos de monocitos fueron estimulados con IL-1 $\beta$  recombinante humana 100 U/ml y se observaron los efectos de dexametasona y cortisol 10 ó 100 nM. A las tres horas de estimulación se observó el aumento de la expresión de IL-1 $\beta$  inducido por la IL-1 $\beta$  exógena (Figura 17). Este efecto de IL-1 fue inhibido por ambos glucocorticoides en forma dosis dependiente aunque los efectos de cortisol son menos marcados (Figura 17).



**Figura 17:** Efectos de IL-1 $\beta$  y glucocorticoides sobre la expresión del RNA mensajero de IL-1 $\beta$ . Monocitos humanos periféricos fueron incubados con 100 U/ml IL-1 $\beta$  en combinación con 10 nM o 100 nM dexametasona (DEX) y 10 nM o 100 nM cortisol (CORT). Tres horas después de la estimulación, se aisló RNA total para su análisis por Northern blot (10  $\mu$ g por calle). A, los filtros fueron hibridizados con una sonda de IL-1 $\beta$  humano de 0.7 Kb marcada con  $^{32}$ P. Los

filtros fueron rehibridizados con una sonda de actina humana de 1 Kb como control de carga. B, análisis densitométrico de la autoradiografía de A realizada mediante la estandarización de las unidades densitométricas relativas con la intensidad de la señal de actina. Resultados similares se obtuvieron en cuatro casos diferentes.

Dado que el agregado de LPS produce el aumento de la liberación de IL-1, intentamos observar los efectos del bloqueo de los efectos de la IL-1 endógena estimulada por LPS sobre la autoinducción de IL-1. Estimulamos cultivos de monocitos humanos periféricos con 1  $\mu$ g/ml LPS y bloqueamos los efectos de IL-1 con 50 ng/ml rIL-1ra solo o en combinación con 100 nM dexametasona. Observamos que la inducción de IL-1 por LPS es parcialmente inhibida por el bloqueo de IL-1 con rIL-1ra. Una inhibición mayor de la expresión de IL-1 se observó en presencia de dexametasona 100 nM y dexametasona 100 nM más 50 ng/ml rIL-1ra (Figura 18).



**Figura 18:** Efectos de IL-1ra recombinante y los glucocorticoides sobre la expresión de IL-1 $\beta$

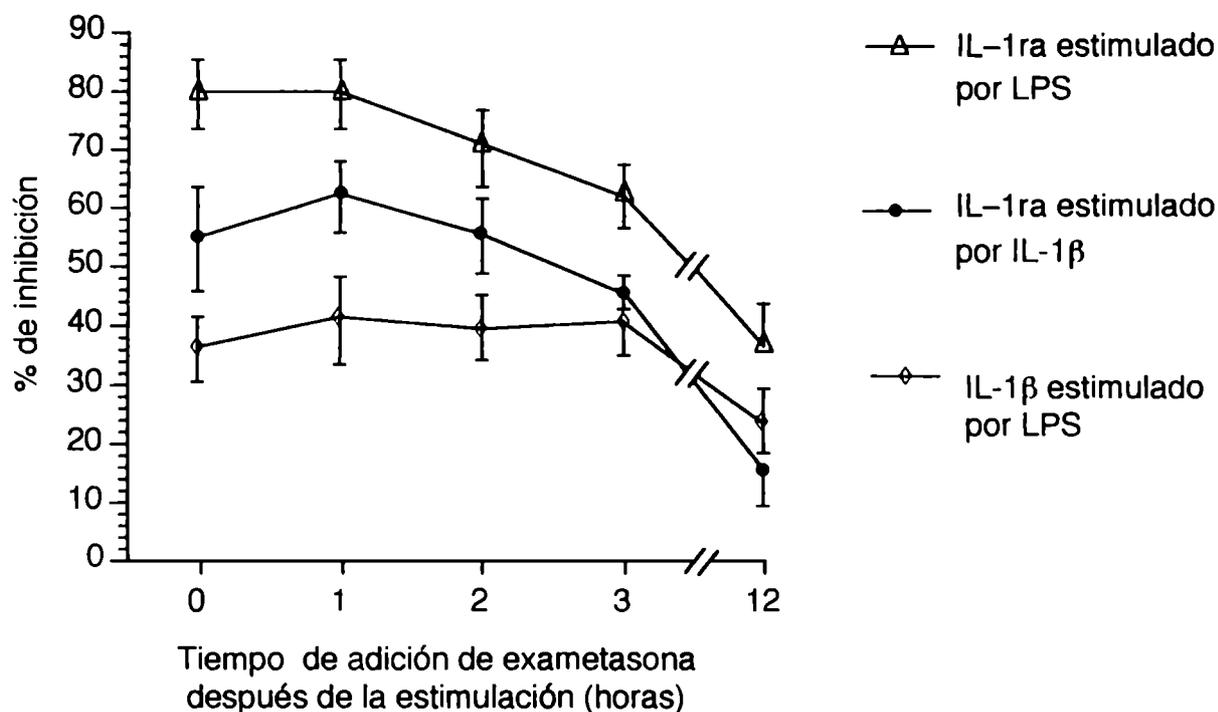
Monocitos humanos periféricos fueron estimulados con LPS 1 $\mu$ g/ml e incubados con 100 nM dexametasona (DEX) en combinación con IL-1ra recombinante (rIL-1ra) 50 ng/ml. Tres horas después de la estimulación, se aisló RNA total para su análisis por Northern blot (10  $\mu$ g por calle). A, los filtros fueron hibridizados con una sonda de IL-1 $\beta$  humano de 0.7 Kb marcada con  $^{32}$ P. Los filtros fueron rehibridizados con una sonda de actina humana de 1 Kb como control de carga.

B, análisis densitométrico de la autoradiografía de A realizada mediante la

estandarización de las unidades densitométricas relativas con la intensidad de la señal de actina. Resultados similares se obtuvieron con células de tres dadores diferentes.

### 3.6. CINÉTICA DE LOS EFECTOS DE GLUCOCORTICOIDES SOBRE EL SISTEMA DE IL-1

Otra estrategia para estudiar las vías de estimulación de LPS sobre el gen de IL-1ra y los mecanismos de acción de los glucocorticoides fue estudiar la cinética de los efectos inhibitorios de los glucocorticoides después de la estimulación con LPS o IL-1. Dado que el pico de producción de IL-1 estimulado por LPS se produce un par de horas antes que el de IL-1ra, decidimos estudiar los efectos de la adición de dexametasona a distintos tiempos después de la estimulación con LPS o IL-1 y medir la producción de IL-1 e IL-1ra con el objetivo de discriminar los efectos inhibitorios producidos sobre uno u otro gen. Observamos las correspondientes estimulaciones de ambos genes por LPS y de IL-1ra por IL-1 $\beta$  y estos efectos fueron inhibidos por dexametasona. Observamos que la inhibición sobre ambos genes es menor a medida que el agregado de la dexametasona se produjo a tiempos más largos después de la estimulación. La inhibición máxima se produjo al agregar dexametasona simultáneamente o una hora después que el LPS. Sin embargo, se observaron distintos patrones cinéticos de inhibición para IL-1 e IL-1ra estimulados por LPS. Mientras la inhibición sobre IL-1 se mantiene constante cuando el glucocorticoide es agregado dentro de las tres primeras horas de estimulación, la inhibición sobre IL-1ra, estimulado tanto por LPS como por IL-1, decae marcadamente sugiriendo la existencia de mecanismos de regulación no mediados por la inhibición de IL-1 (Figura 19). Además, el patrón de inhibición sobre IL-1ra estimulado por el agregado de IL-1 $\beta$  exógena manifiesta el mismo comportamiento que el IL-1ra estimulado por LPS (Figura 19).

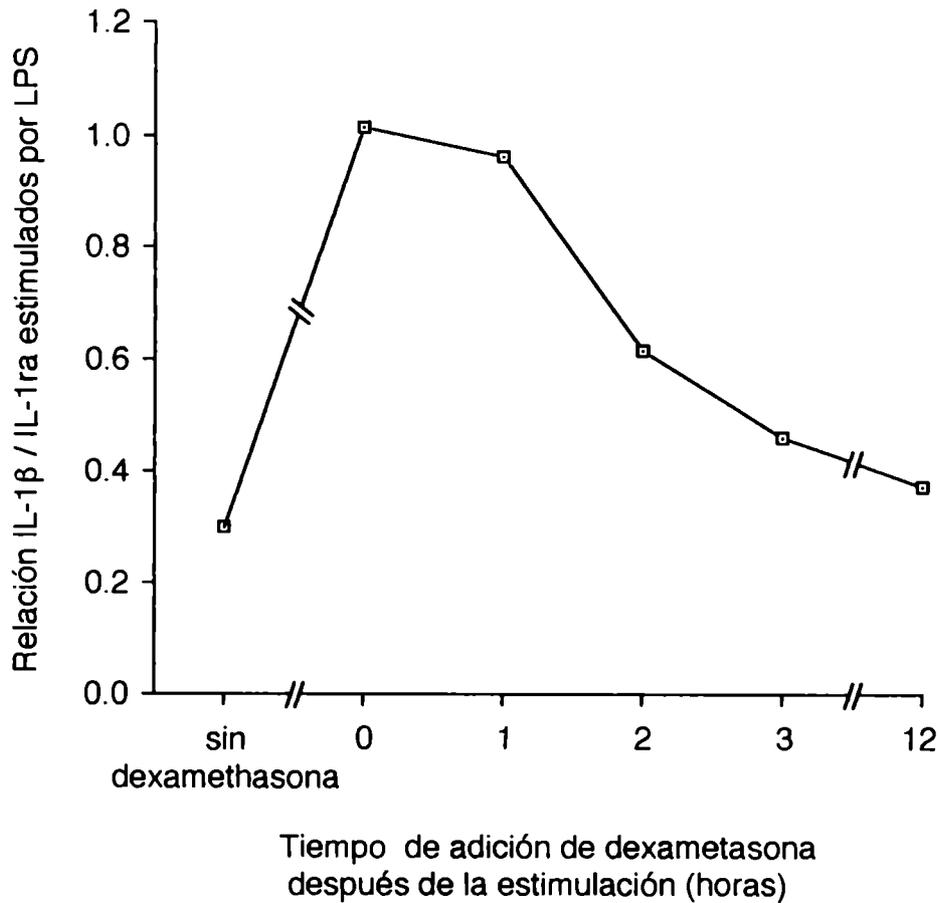


**Figura 19:** Cinética de la inhibición de los glucocorticoides sobre la secreción de IL-1ra e IL-1β.

Monocitos humanos periféricos fueron estimulados con LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  o IL-1 $\beta$  100 U/ml según se indica. Se agregó dexametasona hasta una concentración 100 nM a distintos tiempos después de la estimulación (indicado en las abscisas). Todos los sobrenadantes fueron colectados a las 16 horas de estimulación para la determinación de las concentraciones de IL-1ra e IL-1 $\beta$  por ELISA como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los datos se expresan como porcentaje de inhibición con respecto a los valores estimulados por LPS o IL-1 $\beta$  sin la adición de dexametasona (IL-1ra inducido por LPS = 8500 pg/ml, IL-1ra inducido por IL-1 $\beta$  = 5990 pg/ml, IL-1 $\beta$  inducido por LPS = 2560 pg/ml). Los resultados representan la media de cuadruplicados de cada condición con error standard. Resultados similares se obtuvieron con células de tres donadores diferentes.

Con estos mismos datos, calculamos la proporción de IL-1/IL-1ra presente en los sobrenadantes de cultivo y observamos su variación a distintos tiempos de agregado de glucocorticoides. Dado que la inhibición a tiempos cortos es mayor sobre la producción de IL-1ra que sobre la de IL-1, se verifica el aumento de la

proporción IL-1/IL-1ra comparada con los niveles obtenidos en ausencia de dexametasona. La relación IL-1/IL-1ra decae a medida que la adición de dexametasona se produce a tiempos mayores después de la restimulación. Esto muestra que los glucocorticoides desplazan el balance de IL-1 e IL-1ra y favorecen a tiempos cortos los efectos de IL-1 (Figura 20).

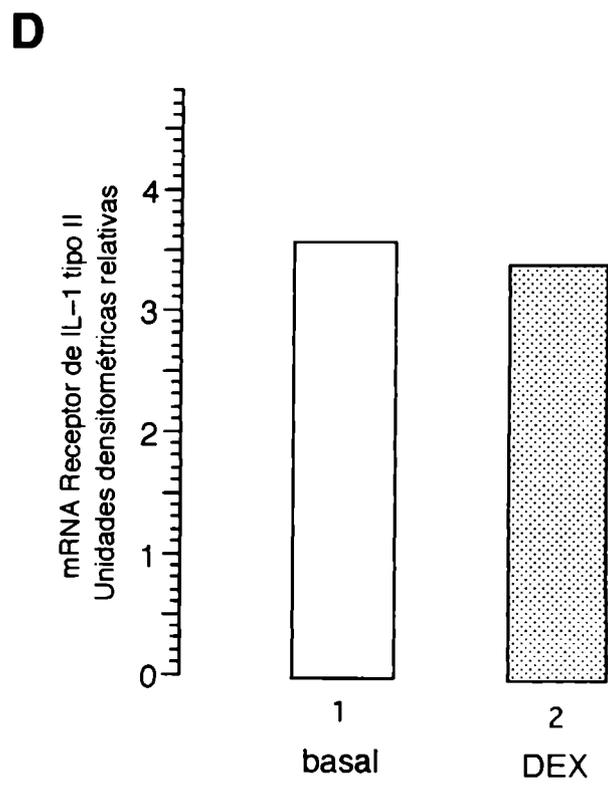
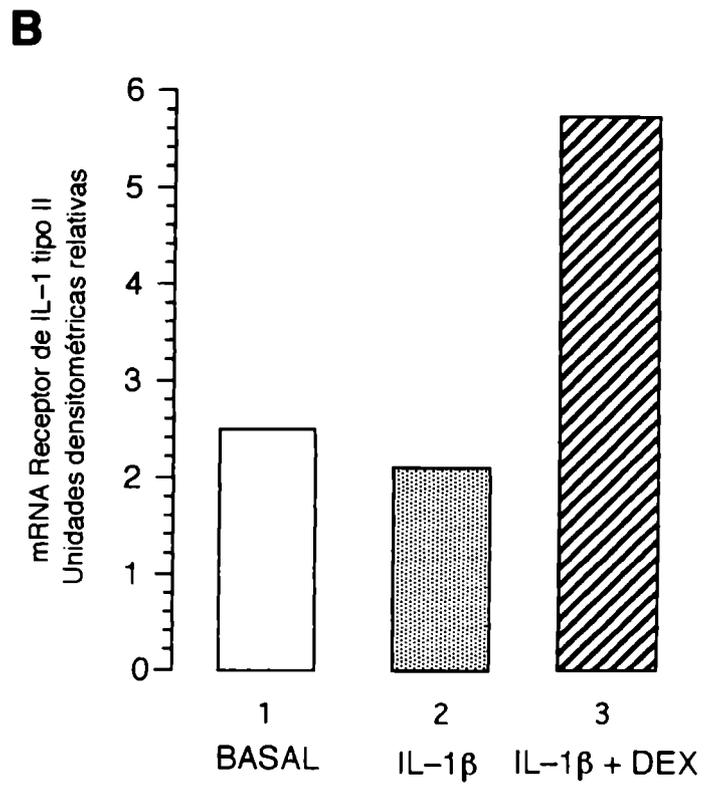
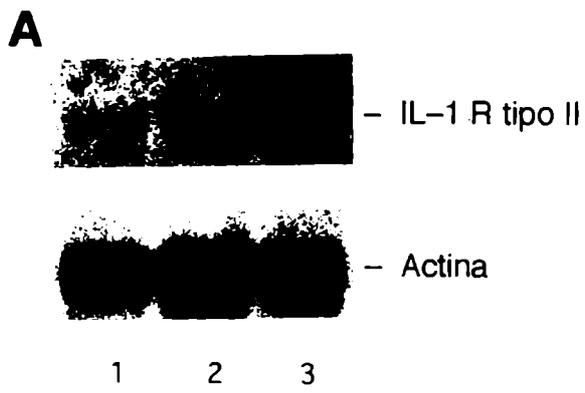


**Figura 20:** Relación IL-1β/IL-1ra en en la cinética de la inhibición por glucocorticoides.

Los mismos datos mostrados en la figura 19 fueron analizados calculando la relación IL-1β/IL-1ra siguiendo la cinética de la inhibición de los glucocorticoides.

### 3.7. EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA EXPRESION DEL RECEPTOR DE IL-1 TIPO II.

Estudiamos también la expresión del receptor de IL-1 tipo II que es el tipo expresado mayoritariamente por los monocitos. En las mismas condiciones en que se observan los efectos inhibitorios de los glucocorticoides sobre la expresión de IL-1ra e IL-1 estimulados tanto por IL-1 como por LPS, se verificó que IL-1 sola o dexametasona sola no tienen efectos sobre la expresión basal del mensajero del receptor de IL-1 tipo II. En cambio, la combinación de IL-1 y dexametasona estimula la expresión de este receptor (Figura 21).



**Figura 21:** Efectos de los glucocorticoides sobre la expresión del receptor de IL-1 tipo II.

Monocitos humanos periféricos fueron estimulados con IL-1 100 U/ml e incubados con dexametasona (DEX) 100 nM. Tres horas después de la estimulación, se aisló RNA total para su análisis por Northern blot (20 µg por calle). A y C, los filtros fueron hibridizados con una sonda para el receptor de IL-1 tipo II humano (IL-1R II) marcada con <sup>32</sup>P. Los filtros fueron rehibridizados con una sonda de actina humana de 1 Kb como control de carga. B y D, análisis densitométrico de las autoradiografías de A y C, respectivamente realizadas mediante la estandarización de las unidades densitométricas relativas con la intensidad de la señal de actina. Resultados similares se obtuvieron con células de cuatro donadores diferentes.

## E. DISCUSION

Está firmemente establecido el efecto inhibitorio que los glucocorticoides tienen sobre el sistema inmune. En cambio, los efectos de las otras hormonas del eje HPA, ACTH y CRH han sido menos estudiados.

En el caso de CRH se han reportado tanto efectos inhibitorios como estimulatorios sobre diversos parámetros que miden el estado de activación del sistema inmune (Singh, V. et al. 1989, Hagan, P. et al. 1992, Chrousos, G.P. 1995, Tsagarakis, S. et al 1995). Los datos de la presente tesis aportan datos que permiten explicar algunas de las diferencias encontradas previamente en los efectos de CRH sobre la producción de citoquinas teniendo en cuenta los distintos niveles de activación del sistema inmune. Hemos encontrado que la CRH puede regular la expresión de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  a nivel de la acumulación de RNA mensajero. De acuerdo a nuestros resultados hay un efecto trifásico de CRH sobre la expresión de RNA mensajero de IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  en monocitos humanos en cultivo. Este efecto depende del estado de activación de los monocitos ya que en condiciones basales CRH produce una estimulación en la expresión de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , con baja estimulación por una pequeña dosis de LPS (1 ng/ml), no hay efectos significativos y cuando la activación por LPS es alta el efecto de CRH es inhibitorio sobre ambos genes.

En cuanto a las mediciones de IL-1 $\alpha$  en sobrenadantes de cultivo por ELISA, se observó que la secreción de proteína sigue el mismo patrón que el RNA mensajero.

La expresión de la proteína de IL-1 también sigue el mismo patrón pero en estos casos los efectos de CRH son de menor magnitud. Solamente es estadísticamente significativa la inhibición de IL-1 $\beta$  en presencia de altas concentraciones de LPS, sin embargo, la reproducibilidad y la consistencia de los resultados obtenidos sugieren que el patrón de regulación por CRH y LPS refleja los efectos observados en la expresión del RNA mensajero correspondiente.

La especificidad de los efectos de CRH fue confirmada al bloquearlos con el antagonista específico  $\alpha$ -helical CRH. Dado que este antagonista tiene un mecanismo de acción competitivo actuando sobre el receptor de CRH, estos resultados también favorecen la interpretación de que el efecto observado en nuestros experimentos es mediado por el receptor de CRH.

Los efectos de CRH sobre la liberación de IL-1ra e IL-1 no siguen un patrón de dosis respuesta. En estos casos la respuesta máxima parece alcanzarse con las dosis más bajas de CRH usadas. Estos resultados se podrían explicar por la presencia de pocos sitios de unión en los monocitos observados por otros autores (Webster, E.L. et al. 1989, 1990) y la consecuente saturación con bajas dosis de CRH.

Los resultados obtenidos pueden evaluarse en el marco de su significado fisiológico tanto a nivel del organismo como a nivel molecular. Nuestros datos sugieren que CRH podría jugar un papel en la modulación de la activación monocitaria. El mecanismo de acción de CRH consistiría en mantener al monocito en un estado de activación intermedio actuando en forma estimuladora cuando el monocito no está activado e inhibiendo al sistema de IL-1 cuando la activación es máxima.

Dado que la acción de CRH es la misma sobre IL-1 e IL-1ra que son moléculas antagónicas, esto sugiere que el nivel de la respuesta del sistema de IL-1 estaría determinado por la CRH de acuerdo al nivel de activación general del sistema inmune.

Este modelo de la acción fisiológica de CRH basado en la interpretación de nuestros datos también está favorecida por el hecho de que los niveles de IL-1ra e IL-1, resultantes de los tratamientos de los monocitos con CRH, LPS o ambos combinados, se encuentran todos en un mismo rango acotado en un nivel intermedio independientemente de la presencia o de la dosis de LPS usada. Por lo tanto la CRH regularía el rango de acción del sistema de IL-1 en los monocitos.

La acción de la CRH podría tener lugar en el sistema porta hipotálamo hipofisario donde la CRH liberada por el hipotálamo alcanza concentraciones altas comparadas con los niveles plasmáticos normales de esta hormona. Los monocitos al circular por el sistema porta y los órganos circumventriculares altamente vascularizados podrían ser afectados por la CRH antes de localizarse en los sitios inflamatorios periféricos.

Dado que la hipófisis es un nexo entre el sistema neuroendócrino y el sistema inmune, la regulación directa de los monocitos en la circulación portal podría ser importante para regular el nivel de la activación monocitaria. Recientemente se ha reportado que la CRH actúa sobre la pituitaria también aumentando la sensibilidad a los efectos de IL-1 sobre la secreción hormonal (Payne, L.C. et al. 1994). Por lo tanto, la interacción a nivel de la hipófisis entre la CRH, IL-1 e IL-1ra podría ser crucial para controlar las interacciones neuroinmunoendócrinas.

Otros sitios de acción podrían ser órganos con alta producción de CRH como por ejemplo la placenta. Se ha observado que los niveles de CRH plasmáticos están más elevados durante el tercer trimestre de embarazo (Sasaki, A. et al. 1984).

Se ha observado recientemente que CRH es producida localmente en sitios periféricos de inflamación y en estos casos la hormona actúa como mediadora del proceso inflamatorio. La administración de anticuerpos neutralizantes de CRH puede inhibir eficientemente el desarrollo del proceso de inflamación (Karalis, K. et al. 1991, Crofford, L.J. et al. 1992). Esto demuestra que la CRH es un factor importante en la cascada regulatoria que desencadena la inflamación. Además también se ha detectado la producción local de CRH en tejido sinovial de articulaciones con procesos inflamatorios de tipo artrítico. La producción de CRH podría deberse a células inmunes como los linfocitos T y B, los cuales son capaces de sintetizar y liberar CRH frente a estímulos mitogénicos (Stephanou, A. et al. 1990, Ekman, R. et al. 1993, Kravchenko, I.V. et al. 1994). Otro sitio de origen de la CRH periférica encontrada en los sitios de inflamación podrían ser las neuronas de los ganglios simpáticos y de las columnas interomediales de la

médula espinal capaces de sintetizar la hormona (Croffod, L.J. et al 1992, Chrousos, G.P. 1995).

En nuestros experimentos descartamos la posibilidad de que los monocitos produzcan CRH y ésta afecte la expresión de los genes en estudio porque la secreción de CRH sólo ha sido detectada hasta el momento en linfocitos T y B. Se ha demostrado que los monocitos no producen CRH (Stephanou, A. et al.1990, Ekman, R. et al. 1993, Kravchenko, I.V. et al. 1994), por lo tanto descartamos que los efectos observados en nuestros tratamientos sean debidos a la producción intrínseca de CRH en nuestros cultivos.

La verificación de efectos opuestos de CRH sobre la regulación del sistema de IL-1 según la presencia o ausencia de LPS indica que existe una estrecha interregulación entre las vías de transducción de señales de los receptores de CRH y de LPS. La transducción de la señal de CRH a través de su receptor de membrana involucra la interacción con la adenilato ciclasa a través de proteína G y el consiguiente aumento de los niveles intracelulares de cAMP (Webster, E.L. et al. 1990). Esto ha sido demostrado en diversos tipos de células que responden a CRH, entre ellos sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoidea y timocitos de ratón. También ha sido demostrado que el cAMP puede aumentar la acumulación de RNA mensajero de IL-1 $\beta$  en ciertas condiciones de cultivo (Hurme, M. et al. 1990). Existe una estimulación sinérgica entre cAMP y ésteres de forbol sobre el gen de IL-1 $\beta$ . Por lo tanto el mecanismo de estimulación de CRH sobre el gen de IL-1 $\beta$  en condiciones basales podría ser el aumento intracelular de cAMP. Sin embargo, en presencia de LPS el cAMP produce efectos dispares sobre la expresión de IL-1 en distintos tipos celulares (Hurme, M. et al. 1990, Ohmori, Y. et al. 1990, Tennenbaum, C.S. et al. 1989). Estas diferencias se podrían explicar por una interacción entre las vías de transducción de señales del LPS con el cAMP que podrían depender a su vez de otras variables como por ejemplo el tiempo de acción de cada estímulo y el grado de diferenciación celular.

De nuestros resultados se deduce también que el cAMP está involucrado en la regulación de la expresión del gen de IL-1ra. En este caso también podrían tener lugar interacciones de crosstalk entre distintos mecanismos de señalización. Este crosstalk intracelular podría explicar las diferencias existentes entre distintos estados de activación de los monocitos. En los sitios de inflamación la respuesta del sistema de IL-1 monocitario variaría de acuerdo a la composición hormonal del microambiente y de acuerdo a la presencia o no de endotoxinas dando lugar a respuestas diferentes según el origen de la inflamación. Dado que esta respuesta puede ser estimulativa o inhibitoria, la CRH estaría involucrada en el control según el cual el monocito inicia o mantiene la respuesta inflamatoria.

Hemos demostrado que la ACTH inhibe la expresión de IL-1ra y de IL-1 $\beta$  estimulada por LPS. Sin embargo, no se registraron efectos estimulatorios de ACTH sobre este sistema lo cual sugiere que la función fisiológica de esta hormona sería inhibir al monocito activado. Los efectos inhibitorios de ACTH sobre el sistema de IL-1 están de acuerdo con el papel inmunosupresor que se le adjudica ya que todos los efectos de ACTH sobre el sistema inmune reportados hasta el momento, a diferencia de los de CRH, son solamente inhibitorios (Bost, K.L. et al. 1990, Johnson, H.M. et al. 1984, 1982). Dada la importancia de la hipófisis en la coordinación de las interacciones neuroinmunoendócrinas, estos efectos de ACTH sobre los monocitos podrían formar parte de los circuitos regulatorios que involucran a esta glándula. Además de la hipófisis, se ha propuesto que otro sitio de síntesis de ACTH serían las células del sistema inmune pero los datos que afirman esta hipótesis son controvertidos y no han sido confirmados por otros autores (Smith, E.M. et al. 1986). Por lo tanto los efectos observados sobre las células del sistema inmune serían debidos a la liberación de ACTH en la hipófisis.

La ACTH transduce su señal en las células de la glándula adrenal mediante un aumento intracelular de cAMP y es probable que por el mismo mecanismo sean

reguladas las respuestas en los monocitos (Clarke, B.L. et al. 1989, Johnson, E.W. 1988, Smith, E.M. et al. 1987). Sin embargo, según nuestros resultados, la interacción de esta vía de transducción de señales no interaccionaría con la de LPS de la misma forma que lo hace cuando el estímulo es CRH.

Evidencias previas indican que el LPS es un potente estimulador tanto de IL-1 como de IL-1ra (Dinarello, C.A. 1992) y por otra parte, IL-1 es capaz de inducir su propia síntesis (Dinarello, C.A. et al. 1987, Warner, S.J.C. et al. 1987). Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que la IL-1 podría inducir la síntesis de IL-1ra al igual que lo hace sobre su propio gen y de esta manera mediar la estimulación por LPS. En este trabajo demostramos que la IL-1 es capaz de estimular en monocitos humanos periféricos la acumulación de RNA mensajero y la liberación de proteína de IL-1ra. Nuestro grupo previamente describió los efectos inhibitorios de los glucocorticoides sobre la expresión de IL-1ra (Arzt, E. et al. 1994) y por lo tanto planteamos como objetivo profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción de los glucocorticoides sobre este sistema. Continuando con estos estudios sobre la acción de los glucocorticoides sobre la expresión de IL-1ra en monocitos hemos comprobado que los glucocorticoides inhiben la expresión tanto de IL-1ra como de IL-1 estimulada por IL-1 y estos efectos tienen lugar sobre la acumulación de RNA mensajero además de la liberación de proteína. El hecho de que el patrón de expresión de RNA mensajero coincide con el patrón de secreción de proteína sugiere que el punto principal de regulación podría ser la acumulación de mRNA. La reversión de los efectos de dexametasona sobre la estimulación de IL-1ra por IL-1 con el antagonista RU 38486 demuestra que estos efectos son específicos y mediados por el receptor de glucocorticoides. La acción de los glucocorticoides es de gran importancia para la regulación de la respuesta de los monocitos frente a una estimulación por endotoxinas bacterianas dado que estas hormonas que se inducen durante una infección estarían regulando por un lado el feedback de IL-1 sobre su propio gen y por otro lado los efectos de IL-1

sobre su receptor a través de la regulación de la expresión de IL-1ra. Esta regulación, por lo tanto, es crucial para controlar el estado de activación del monocito que expresa tanto IL-1ra como IL-1 y su receptor. Pero también es importante para controlar los efectos de IL-1 sobre otros tipos celulares que expresan el receptor de IL-1 mediante la acción del IL-1ra.

Dado que LPS estimula la producción en los monocitos de IL-1, la estimulación de IL-1ra por LPS podría ser directa o estar mediada por IL-1. Así también, la inhibición de IL-1ra estimulado por LPS por los glucocorticoides podría reflejar la inhibición del mediador IL-1. Para estudiar estas alternativas, estudiamos los efectos del bloqueo de IL-1 con anticuerpos específicos o con IL-1ra recombinante durante la estimulación con LPS y la cinética de la inhibición de IL-1 e IL-1ra por glucocorticoides.

Usando anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  hemos demostrado que existe una contribución significativa de IL-1 $\beta$  en la estimulación de la liberación de IL-1ra por LPS. Sin embargo, dado que el bloqueo de IL-1 $\beta$  no inhibe completamente los efectos de LPS, también debe existir una vía de estimulación de IL-1ra independiente de IL-1. La vía de estimulación independiente de IL-1 podría estar mediada por otras citoquinas producidas por el monocito estimulado con LPS como IL-6 o TNF- $\alpha$ . Sin embargo, en esta tesis nos hemos referido a esta última vía como directa en el sentido que no es mediada por componentes del sistema de IL-1. En este caso, el agregado de glucocorticoides junto con el anticuerpo bloquea completamente la producción de IL-1ra pero dado que no se observan diferencias significativas entre los efectos de los glucocorticoides solos o en combinación con el anticuerpo, es posible pensar que los efectos de los glucocorticoides tienen lugar directamente sobre el gen de IL-1ra o bien que estos inhiban ambas vías de estimulación.

Bloqueando los efectos de IL-1 con IL-1ra recombinante fue posible investigar la expresión de los RNA mensajeros de IL-1ra e IL-1. En ambos casos se demostró que IL-1 participa en la estimulación de estos genes por LPS, es decir que tanto

IL-1ra como IL-1(en un loop autoregulatorio) son inducidos en parte por IL-1 durante la estimulación con LPS.

Durante la estimulación de los monocitos por LPS, se estimula en primer lugar la expresión de IL-1, la cual hace un pico una hora después del agregado de LPS (Arzt, E. et al. 1994, Granowitz, E.V. 1991, Ulich, T.R. et al. 1992). Dos horas después del pico de expresión del mensajero de IL-1 se produce el pico de expresión de IL-1ra (Arzt, E. et al. 1994, Granowitz, E.V. 1991, Ulich, T.R. et al. 1992). Este hecho nos llevó a pensar que sería posible discriminar entre los efectos de los glucocorticoides sobre ambos genes agregando dexametasona a distintos tiempos después de la estimulación. Estos estudios cinéticos aportan más evidencias sobre la existencia de dos vías estimuladoras de IL-1ra. Encontramos que durante las primeras horas, mientras la inhibición sobre IL-1 permanece constante, la inhibición sobre IL-1ra decae marcadamente. Los patrones cinéticos obtenidos sugieren que hay un mecanismo directo de estimulación de IL-1ra por LPS y es inhibido por glucocorticoides además del mecanismo mediado por IL-1 que también es inhibido por glucocorticoides. La diferencia en los patrones cinéticos de la inhibición de ambos genes hace improbable que la inhibición de IL-1ra refleje solamente la inhibición de IL-1 y en cambio sugiere que el efecto de los glucocorticoides es directo sobre el gen de IL-1ra. El hecho de que los niveles de inhibición de IL-1 permanecen constantes mientras varían los de IL-1ra no son coherentes con la idea de que los glucocorticoides actúan sólo sobre el gen de IL-1. Sin embargo, este hecho es compatible con la interpretación de que los glucocorticoides actúan sobre el gen de IL-1ra directamente. De todas formas, en base a estos resultados no se puede excluir la participación de otros factores inducibles por LPS que también podrían ser inhibidos por los glucocorticoides.

Dado que el mismo monocito que expresa IL-1 e IL-1ra también expresa receptores para IL-1 planteamos como objetivo estudiar la acción de los glucocorticoides sobre los receptores. Para esto, detectamos la expresión del

receptor de IL-1 tipo II que es la forma mayoritaria presente en monocitos (McMahan, C.J. et al. 1991). El receptor de IL-1 tipo I es expresado por estas células en cantidades indetectables aunque algunos autores observaron efectos de IL-1 mediados por este receptor (Granowitz, E.V. et al. 1992, Heguy, A. et al. 1993). Hemos observado que en las mismas condiciones en que los glucocorticoides inhiben la expresión del sistema de IL-1 estimulan la expresión del receptor de IL-1 tipo II. Sin embargo, IL-1 sola o los glucocorticoides solos no tienen efectos sobre la expresión de este gen. Estos resultados están de acuerdo con datos publicados previamente por otros autores que observaron aumentos en la unión de IL-1 producidos por glucocorticoides en otras células inmunes como linfocitos B o en líneas celulares monocitarias (Akahoshi, T. et al. 1984, Spriggs, M.K. et al. 1990). También ha sido descrito el efecto estimulador de los glucocorticoides sobre la expresión del mRNA de este receptor en células polimorfonucleares (Re, F. et al. 1994).

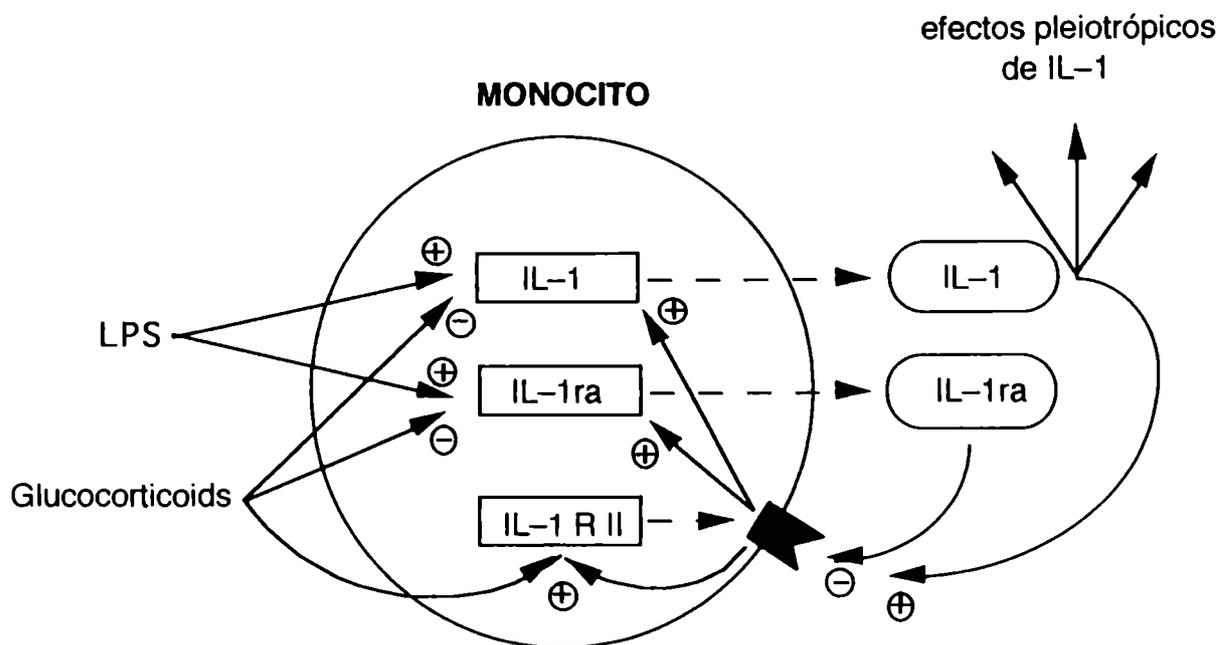
Algunos autores observan efectos de IL-1 mediados por el receptor de IL-1 tipo II pero otros postulan que este receptor no puede transducir señales (Granowitz, E.V. et al. 1992, Sims, J.E. et al. 1993). El receptor de tipo II no tiene un dominio intracelular apreciable y anticuerpos contra este receptor no bloquean efectos de IL-1 como sí lo hacen los anticuerpos contra el receptor de tipo I (Sims, J.E. et al. 1993). Estos resultados llevarían a la interpretación de que este tipo de receptor actuaría inhibiendo los efectos de IL-1 uniendo la IL-1.

Si el receptor de IL-1 tipo II puede transducir señales en monocitos según lo han observado algunos autores (Granowitz, E.V. et al. 1992), el efecto de los glucocorticoides sería estimulador sobre la respuesta a IL-1 porque inhiben IL-1ra y estimulan el receptor de IL-1. En el caso contrario si la acción del receptor de IL-1 tipo II fuera inhibitoria, los glucocorticoides regularían los efectos de IL-1 controlando el balance entre dos antagonistas de los efectos de IL-1, inhibiendo uno de los antagonistas, el IL-1ra y estimulando el otro, el receptor de IL-1 tipo II. Por otra parte, dado que los glucocorticoides aumentan la relación IL-1/IL-1ra el

conjunto de estos datos podría interpretarse según un modelo en el cual los glucocorticoides incrementan la capacidad de respuesta a IL-1 en el monocito.

Los genes de IL-1 e IL-1ra proveen un modelo interesante para estudios de la regulación génica dado que ambos genes parecen derivar de un ancestro común (Eisenberg, S.P. et al. 1991), son expresados por una misma célula (Andersson, J. et al. 1992) pero responden en forma similar o distinta a diferentes estímulos. Se han descrito tres clases de regulación del sistema de IL-1: factores que estimulan uno y no afectan al otro como por ejemplo IgG y GM-CSF que estimulan IL-1ra (Poutsika, D.D. et al. 1991, Arend, W.P. et al. 1991), factores que inhiben IL-1 y estimulan al IL-1ra como TGF- $\beta$  e IL-4 (Turner, M. et al. 1991, Fenton, M.J. et al. 1992, Wong, H.L., et al. 1993, Wahl, S.M. et al. 1993) y factores que estimulan o inhiben a ambos genes como LPS o glucocorticoides (Poutsika et al, 1991; Arend et al, 1991, Arzt, E. et al. 1994). Eso indica que estos genes deben compartir algunas secuencias regulatorias y factores moduladores de la transcripción pero también deben ser afectados de forma diferente por otros. En el caso de los efectos de los glucocorticoides existe un fenómeno interesante: la inhibición del gen de IL-1ra es mediada parcialmente por el receptor de mineralocorticoides (Sauer, J. et al. 1995).

Los glucocorticoides regulan la capacidad de respuesta del monocito a IL-1 mediante varios mecanismos: la inhibición de IL-1ra inducida directamente por LPS o mediada por IL-1, la estimulación de la expresión del receptor de IL-1 tipo II y el cambio de la relación IL-1/IL-1ra. De esta forma los glucocorticoides protegen al organismo de las consecuencias nocivas de la sobreproducción de IL-1 pero al mismo tiempo conservan la capacidad de respuesta del monocito a la IL-1 de acuerdo a los requerimientos del desarrollo del proceso inflamatorio. Estos mecanismos que actúan después de la estimulación con endotoxinas regulan finamente la sensibilidad de los monocitos al feedback estimulador de IL-1 que contribuye a determinar el tipo y cantidad de respuesta inflamatoria.



**Figura 22:** Esquema de las interacciones regulatorias entre LPS, glucocorticoides y el sistema de IL-1 a nivel del monocito.

El conocimiento del funcionamiento del sistema de IL-1 además de permitir la comprensión del papel que juega en el mantenimiento de la homeostasis, también nos permite sentar las bases para su manipulación farmacológica. Las propiedades exclusivamente antagonistas de IL-1ra hacen que sea posible utilizarlo en su forma recombinante para bloquear los efectos inflamatorios de IL-1 sin desencadenar efectos secundarios. Ha sido demostrado que la aplicación de IL-1ra recombinante durante períodos cortos no resulta inmunosupresora. La administración de dos dosis diarias de IL-1ra no afecta la respuesta de las células T citotóxicas ni la producción de anticuerpos (Faherty, D.A. et al. 1992). En modelos experimentales de sepsis, el tratamiento con IL-1ra reduce la mortalidad (Ohlson, K.O. et al. 1990, Fischer, E. et al. 1992). La eficacia del tratamiento de la sepsis con glucocorticoides es dudosa y su uso no obedece a criterios precisos. Dado el complejo patrón temporal de eventos que ocurren durante una infección aguda y la interacción entre estas moléculas (por ejemplo, la inhibición de IL-1ra

por glucocorticoides), el efecto de cualquier terapia antiinflamatoria puede depender del tiempo de su aplicación. El monitoreo de los niveles endógenos de IL-1ra y glucocorticoides durante la endotoxemia puede proveer la bases de los criterios para su aplicación separada o combinada, en las dosis adecuadas y el tiempo del tratamiento durante este proceso patológico. Nuestros datos también contribuyen a la comprensión del funcionamiento del sistema de IL-1 en diversas situaciones patológicas en las cuales los niveles de hormonas del eje HPA se encuentran alterados. En la medida en que estas patologías producen alteraciones en el funcionamiento del sistema inmune mediadas por un desbalance del sistema de IL-1, sería posible corregir estas alteraciones desplazando farmacológicamente el balance de este sistema.

Tomados en conjunto, los resultados de los experimentos de CRH, ACTH y glucocorticoides indicarían que las hormonas del eje HPA tienen efectos inhibitorios sobre el sistema IL-1/ IL-1ra fundamentalmente cuando los monocitos se encuentran activados con LPS. Estos resultados pueden interpretarse según el modelo en el cual una infección bacteriana activa a los monocitos mediante endotoxinas y estos liberan interleuquinas que activan al sistema inmune pero también estimulan la liberación de las hormonas del eje HPA, CRH, ACTH y glucocorticoides. Estas hormonas en conjunto inhibirían la activación del sistema inmune volviéndolo a su estado basal y evitando de esta forma los efectos perjudiciales de su sobreestimulación. Por otra parte, en condiciones basales, las hormonas del eje HPA contribuirían a la homeostasis del sistema inmune modulando la producción de interleuquinas y sus antagonistas.

## **F. CONCLUSIONES**

1. La CRH regula el sistema de IL-1 en forma estimulatoria en monocitos no activados, sin acción con dosis bajas de LPS, y en forma inhibitoria en monocitos activados por dosis altas de LPS. Los efectos de CRH sobre este sistema se observaron a nivel de acumulación de RNA mensajero y de secreción de proteína. Como resultado, la CRH cumpliría con el rol de mantener al monocito en un estadio intermedio de activación.
2. Los efectos de CRH sobre la expresión de IL-1ra e IL-1 $\beta$  en monocitos son mediados por el receptor de CRH a través de cAMP.
3. La ACTH inhibe la expresión del sistema de IL-1 en monocitos activados por LPS.
4. La IL-1 $\beta$  induce la producción de IL-1ra a nivel de acumulación de RNA mensajero y secreción de proteína. Los glucocorticoides inhiben esta inducción.
5. La estimulación de los monocitos con LPS activa la producción de IL-1, la cual a su vez induce su propia síntesis a nivel de acumulación de RNA mensajero.
6. El LPS induce la expresión de IL-1ra por dos vías: una vía directa y otra mediada por IL-1 $\beta$  y otra vía independiente de IL-1 $\beta$  que podría ser directa o mediada por otras citoquinas.

7. Los glucocorticoides actúan sobre el sistema de IL-1 en diversos puntos:

- inhiben la producción de IL-1 $\beta$  estimulada por LPS y su feedback autoregulatorio.

- inhiben la producción de IL-1ra estimulada por IL-1 $\beta$ .

- inhiben la producción de IL-1ra estimulada directamente por LPS.

- aumentan la relación IL-1 $\beta$ /IL-1ra.

Estos resultados sugieren que los glucocorticoides pueden actuar en forma directa sobre la expresión de IL-1ra.

8. Los glucocorticoides en combinación con IL-1 $\beta$  estimulan la expresión del receptor de IL-1 tipo II.

9. El conjunto de los efectos observados de los glucocorticoides sobre el sistema de IL-1 sugieren que estos pueden inhibir los efectos pleiotrópicos de IL-1 sobre otras células. Simultáneamente, a nivel del monocito, los glucocorticoides modulan el balance entre dos antagonistas de IL-1: IL-1ra y el receptor de IL-1 tipo II. La modulación de este balance y el desplazamiento de la relación IL-1 $\beta$ /IL-1ra contribuiría a mantener la sensibilidad del monocito frente a la estimulación de IL-1.

## G. BIBLIOGRAFIA

Abernathy, R. S.; Halberg, F. y Spink, W. W. 1957. Studies on the mechanism of chlorpromazine protection against Brucella endotoxin in mice. *J. Lab. Clin. Med.* 49: 708.

Aird, F., Clevenger, C.V., Prystowsky, M., Redei, E. 1993. Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90,7104.

Akahoshi, T., Oppenheim, J. J., Matsushima, K. 1988. Induction of high-affinity interleukin 1 receptor on human peripheral blood lymphocytes by glucocorticoid hormones. *J. Exp. Med.* 167, 924.

Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T., Kishimoto, T. 1990. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL-6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* 9, 1897.

Alexander, H.R., Gelfand, J.A., Wakabayashi, G., Callahan, M.V., Burke, J., Thompson, R., Dinarello, C.A. 1991. Interleukin-1 receptor antagonist blocks Staphylococcal induced shock in rabbits. *Cytokine* 3, 498.

Alvarez-Mon, M., Kehrl, J.H., Fauci, A.S. 1985. A potential role for adrenocorticotropin in regulating B lymphocyte functions. *J. Immunol.* 135,3823.

Andersson, J., Bjork, L., Dinarello, C.A., Towbin, H., Andersson, U. 1992. Lipopolysaccharide induces human interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 production in the same cell. *Eur. J. Immunol.* 22,2617.

Arend, W.P., Joslin, F.G., Massoni, R.J. 1985. Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin-1 or an interleukin-1 inhibitor. *J. Immunol.* 134,3868.

Arend, W.P. 1991. Interleukin-1 receptor antagonist. A new member of the interleukin-1 family. *J. Clin. Invest.* 88,1445.

Arend, W.P. Smith, M.F., Janson, R.W., Joslin, F.G. 1991. IL-1 receptor antagonist and IL-1 $\beta$  production in human monocytes are regulated differently. *J. Immunol.* 147,1530.

Arend, W.P. 1993. Interleukins and arthritis. IL-1 antagonism in inflammatory arthritis. *Lancet* 341,155.

Arriza, J.L., Weimberger, G, Cerelli, T.M., Glaser, B.L., Handelin, B.L., Houseman, D.E., Evans, R.M. 1987. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: Structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 237,268.

Arya, S.K., Wong-Stall, F., Gallo, R.C. 1984. Dexamethasone mediated inhibition of human T cell growth factor and gamma-interferon messenger RNA. *J. Immunol.* 133,273.

Arzt, E., Costas, M., Finkielman, S., Nahmod, V.E. 1991. Serotonin inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  synthesis by human monocytes. *Life Sciences* 48,2557.

Arzt, E., Fernandez Castello, S., Finocciaro, L.M.E., Criscuolo, M.E., Díaz, A., Finkielman, S., Nahmod, V.E. 1988. Immunimodulation by indoleamines: serotonin

and melatonin action on DNA and interferon- $\gamma$  synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Immunol.* 8,513.

Arzt, E., Stelzer, G., Renner, U., Lange, M., Müller, O.A., Stalla, G.K. 1992. Interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in human corticotrophic adenoma and murine pituitary cell cultures. *J. Clin. Invest.* 90,1944.

Arzt, E., Buric, R., Stelzer, G., Stalla, J., Sauer, J., Renner, U., Stalla, G. 1993. Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation: effects of interleukin-2 and interleukin-6. *Endocrinology* 132,459.

Arzt, E., Sauer, J., Pollmächer, T., Labeur, M., Holsboer, F., Reul, J., Stalla, G.K. 1994. Glucocorticoids suppress interleukin-1 receptor antagonist synthesis following induction by endotoxin. *Endocrinology* 134,672.

Atkins, E. 1989. Fever: historical aspects. En: *Interleukin-1, inflammation and disease*, ed.R. Bomford y B. Henderson, pp3-16. Elsevier, Amsterdam.

Audhya, T., Jain, R., Hollander, C.S. 1991. Receptor-mediated immunomodulation by corticotropin-releasing factor. *Cell. Immunol.* 134,77.

Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmborg, A., Karin, M. 1995. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- $\kappa$ B activity through induction of I $\kappa$ B synthesis. *Science* 270,286.

Bagby, G.C. 1989. Interleukin-1 and hematopoiesis. *Blood Rev.* 3,152.

Balligand, J.L., Ungureanu-Longrois, D., Simmons, W.W., Kobzik, L., Lowenstein, L., Lamas, S., Kelly, R.A., Smith, T.W., Michel, T. 1995. Induction of NO synthase in

rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$ . *Heart. Circ. Physiol.* 37,H1293.

Ban, E., Milon, G.A., Prudhomme, N., Fillion, G., Haour, F. 1991. Receptors for IL-1 in mouse brain. Mapping and neuronal localization in hippocampus. *Neuroscience* 43,21.

Ban, E., Marquette, C., Sarrieau, C., Fitzpatrick, F., Fillion, G., Milon, G., Rostene, W., Haour, F.. 1993. Regulation of Interleukin-1 receptor expression in mouse brain and pituitary by lipopolysaccharide and glucocorticoids. *Neuroendocrinology* 58,581.

Banks, W.A., Kastin, A.J., Durham, D.A. 1990. Bidirectional transport of interleukin-1 alpha across the blood brain barrier. *Brain Res. Bull.* 23,433.

Bateman, A., Singh, A., Kral, T., Solomon, S. 1989. The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrine Rev.* 10,92.

Baxter, J.D., Forsham, P.H. 1972. Tissue effects of glucocorticoids. *Am. J. Med.* 53,573.

Baybutt, H.N., Holsboer, F. 1990. Inhibition of macrophage differentiation and function by cortisol. *Endocrinol.* 127,476.

Beaseley, D., Schwartz, J., Brenner, B.M. 1991. Interleukin-1 induces prolonged L-arginine dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 87, 602.

Berkenbosch, F., Van oers, J., del Rey, A., Tilders, F., Besedovsky, H. 1987. Corticotropin-releasing factor producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science* 238,524.

Bernardini, R.; Kamilaris, T.C.; Calogero, A.E.; Johnson, E.D.; Gomez, M.T.; Gold, P.W., Chrousos, G.P. 1990. Interactions between tumor necrosis factor, hypothalamic corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotropin secretion in the rat. *Endocrinol.* 126,2876.

Bernton, E.W., Beach, J.E., Holaday, J.W., Smallridge, R.C., Fein, H.G. 1987. Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 238,519.

Bertran, G.; Arzt, E.; Resnik, E.; Mosca, C., Nahmod, V.E. 1992. Inhibition of interferon gamma production by peripheral blood mononuclear leukocytes of patients with sarcoidosis. *Chest* 101,996.

Besedovsky, H., Del Rey, A., Sorkin, E., Dinarello, C.A. 1986. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233,652.

Besedovsky, H., Del Rey, A. 1992. Immune-endocrine interactions: Integrative role of cytokines. *Front. Neuroendocrinol.* 13,61.

Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E., Da Parada, M., Burri, R., Honneger, C.G. 1983. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. *Science* 221,564.

Beutler, B., Milsark, I.W., Cerami, A. 1985. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229, 869.

Beutler, B., Krichin, N., Milsark, I.W., Luedke, C., Cerami, A. 1986. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: Mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 232,977.

Blalock, J.E. 1984. The immune system as a sensory organ. *J. Immunol.* 132,1067.

Bost, K.L., Clarke, B.L., Xu, J., Kiyono, H., McGhee, J.R., Pascual, D. 1990. Modulation of IgM secretion and H chain mRNA expression in CH12.LX.C4.5F5 cells by adrenocorticotrophic hormone. *J. Immunol.* 145,4326.

Boumpas, D.T., Anastassiou, E.D., Older, S.A., Tsokos, G.C., Nelson, D.L., Balow, J.E. 1991. Dexamethasone inhibits human interleukin-2 but not interleukin-2 receptor gene expression in vitro at the level of nuclear transcription. *J. Clin. Invest.* 87,1739.

Bozzola, M., Valtorta, A., Moretta, A., Montagna, D., Maccario, R., Burgio, G.R. 1988. Modulating effect of growth hormone (GH) on PHA-induced lymphocyte proliferation. *Thymus* 12,157.

Breder, C.D., Dinarello, C.A., Saper, C.B. 1988. Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science* 240.321.

Bristulf, J., Simoncsits, A., Bartfai, T. 1991. Characterization of a neuronal interleukin-1 receptor and the corresponding mRNA in the mouse anterior pituitary cell line AtT-20. *Neurosci. Lett.* 128,173.

Brooks, J.W., Mizel, S.B. 1994. Interleukin-1 signal transduction. *Eur. Cytokine Netw.* 5,547.

Brown, S.L., Smith, L.R., Blalock, J.E. 1987. Interleukin-1 and interleukin-2 enhance proopiomelanocortin gene expression in pituitary cells. *J. Immunol.* 139,3181-3183.

Buchfelder, M., Fahlbusch, R., Adams, E.M., Roth, M., Thierauf, P. 1991. Growth characteristics of invasive pituitary adenomas. *J. Endocrinol. Invest.* 14 (Suppl. 1): 33.

Burger, D., Chicheportiche, R., Giri, J.G., Dayer, J.M. 1995. The inhibitory activity of human interleukin-1 receptor antagonist is enhanced by type II interleukin-1 soluble receptor and hindered by type I interleukin-1 soluble receptor. *J. Clin. Invest.* 96,38.

Burke, F., Stuart Naylor, M., Davies, B., Balkill, F. 1993. The cytokine wall chart. *Immunol. Today* 14,165.

Caldenhoven, E., Liden, J., Wissink, S., Van de Stolpe, A., Raaijmakers, J., Okret, S., Gustafsson, J.A., Van der Saag, P. 1995. Negative cross-talk between rel-A and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol. Endo.* 9,401.

Carter, D.B., Deibel, M.R., Dunn, C.J., Tomich, C.S., Laborde, A.L., Slightom, J.L., Berger, A.E., Bienkowsky, M.J., Sun, F.F., McEwan R.N., Harris, P.K.W., Yem, A.W., Waszak, G.A., Chozay, J.G., Sieu, L.C., Hardee, M.M., Zurcher-Neely, H.A., Reardon, I.M., Heinrichson, R.L., Truesdell, S.E., Eessalu, T.E., Taylor, B.M., Tracey,

D.E. 1990. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 344,633.

Carr, D.J.J., DeCosta, B.R., Jacobson, A.E., Rice, K.C., Blalock, J.E. 1990. Corticotropin-releasing hormone augments natural killer cell activity through a naloxone sensitive pathway. *J. Neuroimmunol.* 28,53.

Casagli, M.C., Borri, M.G., Bigio, M., Rossi, R., Nucci, D., Bossu, P., Boraschi, D., Antoni, G. 1989. Different conformation of purified interleukin-1 beta from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* is related to different level of biological activity. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 162,357.

Cassini-Raggi, V., Kam, L., Chong, Y.J.T., Fiocchi, C., Pizarro, T.T., Comminelli, F. 1995. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *J. Immunol.* 154,2334.

Cavaillon, J.M. 1994. Cytokines and macrophages. *Biomed. Pharmacother.* 48,445.

Charlton, B.G., Ferrier, I.N., Perry, R.H. 1987. Distribution of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in human brain. *Neuropeptides* 10,329.

Chen, R., Lewis, K.A., Perrin, M.H., Vale, W.W. 1993. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90,8967.

Chensue, S.W., Bienkowsky, M., Eessalu, T.E., Warmington, K.S., Hershey, S.D., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L. 1993. Endogenous IL-1 receptor antagonist protein (IRAP) regulates schistosome egg granuloma formation and the regional lymphoid response. *J. Immunol.* 151,3654.

Chikanza, I.C., Roux-Lombard, P., Dayer, J.M., Panayi, G.S. 1995. Dysregulation of the in vivo production of interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumat.* 38,642.

Chomarat, P., Vannier, E., Dechanet, J., Rissoan, M. C., Banchereau, J., Dinarello, C. A., Miossec, P. 1995. Balance of IL-1 receptor antagonist/IL-1 $\beta$  in rheumatoid synovium and its regulation by IL-4 and IL-10. *J. Immunol.* 154, 1432.

Chrousos, G.P. 1995. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *New England J. Med.* 332,1351.

Clarke, B., Bost, K.L. 1989. Differential expression of functional adrenocorticotrophic hormone receptors by subpopulations of lymphocytes. *J. Immunol.* 143,464.

Cohen, J.J. Duke R.C. 1984. Glucocorticoids activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* 132,38.

Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J.G., Dower, S.K., Sims, J.E., Mantovani, A. 1993. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261,472.

Colota, F., Dower, S.K., Sims, J.E., Mantovani, E. 1994. The type II decoy receptor: a novel regulatory pathway for interleukin-1. *Immunol. Today* 15,562.

Comminelli, F., Nast, C.C., Duchini, A., Lee, M. 1992. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. *Gastroenterology* 103,65.

Crabtree, G.R. Munck, A., Smith, K.A. 1980. Glucocorticoids and lymphocytes II. Cell cycle dependent changes in glucocorticoid receptor content. *J. Immunol.* 125,13.

Crane, W.A.J., Loomes, R.S. 1967. Effect of age, sex, and hormonal state on tritiated thymidine uptake by rat pituitary. *Brit. J. Cancer* 21,787.

Crofford, L.J., Sano, H., Karalis, K., Webster, E.L., Goldmuntz, E.A., Chrousos, G.P., Wilder, R.L. 1992. Local secretion of corticotropin-releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.* 90,2555.

Cronstein, B.N., Kimmel, S.C. Levine, R.I., Martiniuk, F., Weissman, G. 1992. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89,9991.

Cunningham, E.T., Wada, E., Carter, D.B., Tracey, D.E., Battery, J.F., De Souza, E.B. 1992. In situ histochemical localization of interleukin-1 type I receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of the mouse. *J. Neurosci.* 3,1101.

Cunningham, E.T.; Wada, E.; Carter, D.; Tracey, D.; Battey, J., De Souza, E.B. 1991. Localization of interleukin-1 receptor messenger RNA in murine hippocampus. *Endocrinol.* 128,2666.

Cupps, T.R., Fauci, A.S. 1982 Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol. Rev.* 65,133.

Dallman, M.F., Akana, S.F., Cascio, C.S., Darlington, D.N., Jacobson, L., Levin, N. 1987. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog. Horm. Res.* 43,113.

Danis, V.A., Millito, M., Hyland, V.J., Greenan, D. 1995. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) gene polymorphism. *Clin. Exp. Immunol.* 99,303.

Dave, J.R., Eiden, L.E., Eskay, R.E. 1985. Corticotropin-releasing factor binding to peripheral tissue and activation of the adenylate cyclase-adenosine 3'5' monophosphate system. *Endocrinology* 116,2152.

Debets, J. M. H.; Ruers, T. J. M.; Van Der Linden, M. P. M. H.; Van Der Linden, C. J., Buurman W. A. 1989. Inhibitory effects of corticosteroids on the secretion of tumour necrosis factor (TNF) by monocytes is dependent on the stimulus inducing TNF synthesis. *Clin. Exp. Immunol.* 78, 224.

Dejana, E., Breviario, F., Erroi, A., Bussolino, F., Mussoni, I., Gramse, M., Pintucci, G., Casali, B., Dinarello, C.A., Van Damme, J., Mantovani, A. 1987. Modulation of endothelial cell functions by different molecular species of interleukin-1. *Blood* 69,695.

Denicoff, K.D., Durkin, T.M., Lotze, M.T., Quinlan, P.E., Davis, C.L., Listwak, S.J., Rosemberg, S.A., Rubinow, D.R. 1989. The neuroendocrine effects of interleukin-2 treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69,401.

De Souza, E.B., Insel, T.H., Perrin, M.H., Rivier, J., Vale, W.W., Kuhar, M.J. 1985. Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. *J. Neurosci.* 5,3189.

De Souza, E.B., Webster, E.L., Grigoriadis, D.E., Tracey, D.E. 1989. Corticotropin releasing factor (CRF) and Interleukin-1 (IL-1) receptors in the brain-pituitary-immune axis. *Psychopharmacol. Bull.* 25,299.

Dinarelli, C.A., Ikejima, T., Warner, S.J.C., Orencole, S.F., Lonneman, G., Cannon, J.G., Libby, P. 1987. Interleukin-1 induces interleukin-1. I. Induction of circulating interleukin-1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J. Immunol.* 139,1902.

Dinarelli, C.A., 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77,1627.

Dinarelli, C.A. 1994. Interleukin-1. In "The cytokine handbook". Academic press limited. 1994.

Dohanics J. E. H.G., Verbalis J.G. 1991. Hyponatremia-induced inhibition of magnocellular neurons caused stressors-selective impairment of stimulated adrenocorticotropin secretion in rats. *Endocrinology* 128, 331.

Dower, S.K., Kronheim, S., March, C.J., Conlon, P.J., Hopp, T., Gillis, S., Urdal, D.L. 1985. Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for interleukin-1. *J. Exp. Med.* 162,501.

Dracott, B.N., Smith, C.E.T. 1979. Hydrocortisone and the antibody response in mice I. Correlations between serum cortisol levels and cell numbers in thymus, spleen, marrow and lymph nodes. *Immunology* 38,429.

Edwards,C.K., Yunger,L.M., Lorence,R.M., Dantzer,R., Kelley,K.W. 1991. The pituitary gland is required for protection against lethal effects of *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88,2274.

Edwards, C.K., Lorence, R.M., Dunham, D.M., Arkins, S., Yunger, L.M., Greager, J.A., Walter, R.J., Dantzer, R., Kelley, K.W. 1991. Hypophysectomy inhibits the synthesis of tumor necrosis factor by rat macrophages: partial restoration by exogenous growth hormone or interferon gamma. *Endocrinology* 128,989.

Eisenberg, S.P., Evans, R.J., Arend, W.P., Verderber, E., Brewer, M.T., Hannum,C.H., Thompson,R.C. 1990. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleuki-1 receptor atagonist. *Nature* 343,341.

Ekman R, Servenius B, Castro MG, Lowry PJ, Cederlund AS, Bergman O, Sjogren HO 1993 Biosynthesis of corticotropin-releasing hormone in human T-lymphocytes. *J. Neuroimmunol* 44,7.

Ensoli, B., Barillari, G., Gallo, R.C. 1992. Cytokines and growth factors in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Immunol. Rev.* 127,147.

Evans, R.M., 1988. The steroid and thyroid superfamily. *Science* 240,889.

Exon, J.H., Bussiere, J.L., Williams, J.R. 1990. Hypophisectomy and growth hormone replacement effects on multiple immune responses in rat brain. *Behavior and Immunity* 4,118.

Ezzat, S., Melmed, S. 1990 The role of growth factors in the pituitary. *J. Edocrinol. Invest.* 13,691.

Faessler, R., Dietrich, H., Kroemer, G., Schwarz, S., Bresinschek H.P., Wick, G. 1988. Diminished glucocorticoid tonus in Obese strain (OS) chickens with spontaneous autoimmune thyroiditis: increased plasma levels of a physiochemically unaltered corticosterone-binding globulin but normal total corticosterone plasma concentrations and normal glucocorticoid receptor contents in lymphoid tissues. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 30,1.

Fauci, A.S. 1976. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. II. Differential effects of in vivo hydrocortisone, prednisolone and dexamethasone on in vitro expression of lymphocyte function. *Clin. Exp. Immunol.* 24,54.

Fenton, M.J., Buras, J.A., Donnelly, R.P. 1992. IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes. *J. Immunol.* 149,1283.

Fibbe, W.E., Falkenburg, J.H.F., Schaafsma, M.R., Willemze, R. 1989. The hematopoietic activities of interleukin-1. *Biotherapy* 1,263.

Firestein, G.S., Berger, A.E., Tracey, D.E., Chosay, J.G., Chapman, D.L., Payne, M.M., Yu, C., Zvaifler, N.J. 1992. IL-1 receptor antagonist protein production and gene expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. *J. Immunol.* 149,1054.

Fischer, E., Marano, M.A., van Zee, K.J., Hawes, A.S., Rock, C.S., Kenney, J.S., Remick, D.G., Bloedow, D.C., Hudson, A.A., Thompson, R.C., Lowry, S.F., Moldawer, L.L. 1992. IL-1 receptor blockade improves survival and hemodynamic performance in *E. coli* septic shock, but fails to alter host response to sublethal endotoxemia. *J. Clin. Invest.* 89,1551.

Fisher, E., Van Zee, K., Marano, M.A., Rock, C.S., Kenney, J.S., Poutsika, D.D., Dinarello, C.A., Lowry S.F., Moldawer, L.L. 1992. Interleukin-1 receptor antagonist circulates in experimental inflammation and in human disease. *Blood* 79,2196.

Frei, K.; Bodmer, S.; Schwerdel, C., Fontana, A. 1985. Astrocytes of the brain synthesize interleukin-3 like factors. *J. Immunol.* 135,4044.

Gaillard, T.R.; Turnil, I. D.; Sapino, P. y Muller, A.F. 1990. Tumor necrosis factor inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinol.* 127,101.

Galve de Rochemonteix, B., Nicod, L. P., Chicheportiche, R., Lacraz, S., Baumberger, Ch., Dayer, J. M. 1993. Regulation of interleukin-1ra, interleukin-1 $\alpha$ , and interleukin-1 $\beta$  production by human alveolar macrophages with phorbol myristate acetate, lipopolysaccharide, and interleukin-4. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8, 160.

Gatti, G., Masera, R.G., Bateman, A., Sartori, M.L., Pallavicini, L., Maina, L., Staurenghi, A., Solomon, S., Angeli, A. 1992. Effects of CRH, ACTH, and the corticostatin HP-4 on the spontaneous NK cell activity and susceptibility to endogenous modifiers. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 3,159.

Gillis, S., Crabtree, G.R., Smith, K.A. 1979. Glucocorticoid- induced inhibition of T cell growth factor production. *J.Imunol.* 123,1624.

Gilman, A.G. 1987. G proteins: transducers of receptor generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56,615.

Gottschall, P. E.; Koves, K.; Mizuno, K.; Tatsuno, I., Arimura, A. 1991. Glucocorticoid upregulation on interleukin-1 receptor expression in a glioblastoma cell line. *Am. J. Physiol.* 261: E362.

Gousse, G. C. 1994. Effects of recombinant interleukin-1 receptor antagonist. *Am. J. Hosp. Pharm.* 51:1253.

Granowitz, E.V., Clark, B.D., Vannier, E., Callahan, M.V., Dinarello, C.A. 1992. Effect of interleukin-1 (IL-1) blockade on cytokine synthesis: I. IL-1 receptor antagonist inhibits IL-1 induced cytokine synthesis and blocks the binding of IL-1 to its type II receptor on human monocytes. *Blood* 79,2356.

Granowitz, E.V., Clark, B.D., Mancilla, J., Dinarello, C.A. 1991 a. Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to the type II interleukin-1 receptor. *J. Biol. Chem.* 266,14147.

Granowitz, E.V., Santos, A., Poutsika, D.D., Cannon, J.G., Wilmore, D.A., Wolf, S.M., Dinarello, C.A. 1991. Circulating interleukin-1 receptor antagonist levels during experimental endotoxemia in humans. *Lancet* 338,1423.

Gruss, H.J., Dolken, G., Brach, M.A., Mertelsman, R., Herrman, F. 1992. High concentrations of the interleukin-1 receptor antagonist in serum of patients with Hodgkin's disease. *Lancet* 340,968.

Hagan, P., Poole, S., Bristow, A. 1992. Immunosuppressive activity of CRF. Inhibition of IL-1 and IL-6 production by human mononuclear cells. *Biochem. J.* 281,251.

Hama, T.; Miyamoto, M.; Tsukui, H.; Nishio, C., Hatanaka, H. 1989. Interleukin-6 as neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. *Neurosci. Lett.* 104,340.

Hamilton, T.A., Adams, D.O. 1987. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol. Today* 8,151.

Hammernberg, C., Arend, W.P., Fisher, G.J., Chan, L.S., Breger, A.E., Haskill, J.S., Voorhees, J.J., Kooper, K.D. 1992. Interleukin-1 receptor antagonist in normal and psoriatic epidermis. *J. Clin. Invest.* 90,571.

Hart, P. H.; Whitty, G. A.; Burggess, D. R.; Croatto, M., Hamilton, J. A. 1990. Augmentation of glucocorticoid action on human monocytes by interleukin-4. *Lymphokine Res.* 9, 147.

Heguy, A., Baldari, C.T., Censini, S., Ghiara, P., Telford, J.L. 1993. A chimeric type II/ Type I interleukin-1 receptor can mediate interleukin-1 induction of gene expression in T cells. *J. Biol. Chem.* 268,10490.

Hermus, A., Sweep, C. 1990. Cytokines and the hypothalamic- pituitary adrenal axis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 37,867.

Hollenberg, S.M. Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., Evans, M. 1985. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318,635.

Houben, H., Denef, C. 1990. Regulatory peptides produced in the anterior pituitary. *Trends Endocrinol. Metabol.* 1,398.

Huang, Y., Blatt, L.M., Taylor, M.W. 1995. Type I interferon as an antiinflammatory agent: inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin-1 $\beta$  and induction of interleukin-1 receptor antagonist. *J. Interf. Cyt.Res.* 15,317.

Hurme, M., Serkkola, E., Ronni, T., Silvennoinen, O. 1990. Control of IL-1 $\beta$  expression by protein kinase C and cyclic adenosine monophosphate in myeloid leukemia cells. *Blood* 76:2198.

Hurme, M., Siljander, P., Anttila, H. 1991. Regulation of IL-1  $\beta$  by glucorticoids in human monocytes: the mechanism of action depends on the activation signal. *Bioq. Biophys. Res. Comm.* 180, 1383.

Irwin, M.R., Vale, W., Britton, K. 1987. Central corticotropin releasing factor suppresses natural killer cytotoxicity. *Brain, Behavior and Immunity* 1,81.

Irwin, M.R., Vale, W., Rivier, C. 1990. Central corticotropin releasing factor mediates the suppressive effects of stress on natural killer cytotoxicity. *Endocrinology* 126,2837.

Irwin, M. 1994. Stress induced immune suppression: role of brain corticotropin-releasing hormone and autonomic nervous system mechanisms. *Adv Neuroimmunol* 4:29.

Johnson, H.M., Smith, E.M., Torres, B.A., Blalock, J. 1982. Regulation of the in vitro antibody response by neuroendocrine hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79,4171.

Johnson, H.M., Torres, B.A., Smith, E.M., Dion, D., Blalock, J. 1984. Regulation of lymphokine (gama-interferon) production by corticotropin. *J. Immunol.* 132,246.

Johnson, H.M., Blalock, J.E., Smith, E.M. 1988. ACTH receptor-mediated induction of leukocyte cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157,1205.

Jones, T.H., Justice, S., Price, A., Chapman, K. 1991. Interleukin-6 secreting human pituitary adenomas in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 73,207.

Jones, T.H., Kennedy, R.L., Justice, S.K., Price, A. 1993. Interleukin-1 stimulates the release of interleukin-6 from cultured human pituitary adenoma cells. *Acta Endocrinol* 128,405.

Jones, T.H., Daniels, A., James, R., Justice, S., McCorkle, R., Price, A., Kendall-Taylor, P., Weetman, A., 1994. Production of bioactive and immunoreactive interleukin 6 and expression of IL-6 messenger aRNA by human pituitary adenomas. *J.Clin. Endocr. Met.* 78,180.

Kamegai, M.; Kunishita, T.; Tokuchi, F.; Nishizawa, M., Tabira, T. 1989. Interleukin-3 promotes neurite outgrowth and elevates choline acetyltransferase activity in vitro. *Proc. Jpn. Acad.* 65,17.

Kanno, K., Hirata, Y., Imai, T., Iwashina, M., Marumo, F. 1994. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene by interleukin-1 $\beta$  in rat vascular endothelial cells. *Heart Circ. Physiol.* 36,H2318.

Kaplansky, G., Porat, R., Aiura, K., Erban, J.K., Gelfand, J.A., Dinarello, C.A. 1993. *blood* 81,2492.

Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP. 1991. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 254:421.

Karant, S. 1991. The influence of dopamine (DA), luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) by the anterior pituitary. In: *Proceedings of the 73rd Annual Meeting of the Endocrine Society, Washington DC*, p.210.

Kent, S; Bluthé, R; Kelley, K, Dantzer, R. 1992. Sickness behavior as a new target for drug development. *TIPS* 13,24-28.

Kishimoto, T., Taga, T., Akira, S. 1994. Cytokine signal transduction. *Cell* 76,253.

Knudsen, P. J.; Dinarello, C. A., Strom T. B. 1987. Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin-1 in U937 cells. *J. Immunol.* 139, 4129.

Koenig, A., Muehlbauer, R.C., Fleisch, H. 1990. Tumor necrosis factor and interleukin-1 stimulate bone resorption in vivo as measured by <sup>3</sup>H tetracycline excretion from prelabeled mice. *J. Bone Miner. Res.* 3,621.

Koenig, J.I., Snow, K., Clark, B.D., Toni, R., Cannon, J.G., Shaw, A.R., Dinarello, C.A., Reichlin, S., Lee, S.L., Lechan, R.M. 1990. Intrinsic pituitary IL-1 $\beta$  is induced by bacterial LPS. *Endocrinology* 126,3053.

Koff, W.C., Dunegan, M.A. 1985. Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones. *J. Immunol.* 135,350.

Koh, W.S., Yang, K.H., Kaminsky, N.E. 1995. Cyclic AMP is an essential factor in immune responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206,703.

Kravchenko, I.V., Furalev, V.A. 1994. Secretion of immunoreactive corticotropin-releasing factor and adrenocorticotrophic hormone by T- and B lymphocytes in response to cellular stress factors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 204:828.

Kroemer, G., Neu, N., Kuehr, T., Dietrich, H., Faessler, R., Hala, K., Wick, G., 1989. Immunogenetic analysis of spontaneous autoimmune thyroiditis of Obese strain chickens. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 52,202.

Labeur, M., Nahmod, V.E., Finkielman, S., Arzt, E. 1991. Lesions of the medial septal nucleus produce a long lasting inhibition of T lymphocyte proliferation. *Neurosci. Lett.* 125,129.

Labeur, M.S., Arzt, E., Wiegers, G.J., Holsboer, F., Reul, J.M.H.M. 1995. Long-term intracerebroventricular corticotropin-releasing hormone administration induces distinct changes in rat splenocyte activation and cytokine expression. *Endocrinology* 136:2678.

Landolt, A.M., Shibata, T., Leihues, P.K., Tuncdogan, E. 1988. Growth of human pituitary adenomas: facts and speculations. *Advances in Biosciences* 69,53.

Larric, J.W. 1989. Native interleukin-1 inhibitors. *Immunol. Today* 10,61.

Lee, S., Tsou, A.P., Chan, H., Thomas, J., Petrie, K., Eugui, E.M., Allison, A.C. 1988. Glucocorticoids selectively inhibits the transcription of the interleukin-1 $\beta$  gene and decrease the stability of interleukin-1 $\beta$  mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85,1204.

Lew, S.J., Singh, V.K., 1992. Stimulation of interleukin 6 production by corticotropin releasing factor. *Cell. Immunol.* 143, 220..

Licino, J., Wong, M., Gold, P.W. 1991. Localization of interleukin-1 receptor antagonist mRNA in rat brain. *Endocrinology* 129,562.

Lieberman, A.P.; Pitha, P.; Shin, H., Shin, M. 1989. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *P.N.A.S. USA* 86,6348-6352.

Lotze, M.T., Frana, L.W., Sharrow, S.O., Robb, R.J., Rosenberg, S.A. 1985. In vivo administration of purified human interleukin-2. I. Half life and immunologic effects of the Jurkat cell line-derived IL-2. *J.Immunol.* 134,157.

Louie, S., Cai, J., Law, R., Lin, G., Lunardi-Iskandar, Y., Jung, B., Masood, R., Gills, P. 1995. Effects of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in AIDS-Kaposi's sarcoma. *J. Acq. Immune Def. Syn.Hum. Retrovirol.* 5,455.

Low, K.G., Arevalo, T.V., Melner, M.H. 1987. Interleukin-2 regulation of proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 murine pituitary tumor cells. In: *Proceedings of the 69th Annual Meeting of the Endocrine Society, Indianapolis.* p.271.

Luedke, C. E., Cerami, A. 1990. Interferon- $\gamma$  overcomes glucocorticoid suppression of cachectin/tumour necrosis factor biosynthesis by murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 86,1234.

MacPhee, I.A., Antoni, F.A., Wason, D.W. 1989. Spontaneous recovery of rats from experimental allergic encephalomyelitis is dependent on regulation of the immune system by endogenous adrenal corticosteroids. *J.Exp.Med.* 169,431.

Mandrup-Poulsen, T., Zumsteg, U., Reimers, J., Pociot, F., Morch, L., Helqvist, S., Dinarello, C.A., Nerup, J. 1993. Involvement of interleukin 1 and interleukin 1 antagonist in pancreatic  $\beta$ -cell destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *Cytokine* 5,185.

Marsh, C. B., H. A. Pope, and M. D. Wewers. 1994. Fc $\gamma$  receptor cross-linking down-regulates IL-1 receptor antagonist and induces IL-1 $\beta$  in mononuclear phagocytes stimulated with endotoxin or *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 152:4604.

Matta, S.G., Linner, K.M., Sharp, B.M. 1993. Interleukin-1a and interleukin-1b stimulate adrenocorticotropin secretion in the rat through a similar hypothalamic receptor(S): effects of interleukin-1 receptor antagonist protein. *Neuroendocrinology* 57,14.

McGillis, J.P., Park, P., Rubin-Fletcher, P., Turck, C., Dallman, L.F., Payan, D.G. 1989. Stimulation of rat B-lymphocyte proliferation by corticotropin releasing factor. *J. Neurosci. Res.* 23,346.

McMahan, C.J., Slack, J.L., Mosley, B., Cosman, D., Lupton, S., Brunton, L.L., Grubin, C.E., Wignall, J.M., Jenkins, N.A., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Huebner, K., Croce, C.M., Canizzaro, L.A., Benjamin, D., Dower, S.K., Spriggs, M.K., Sims, J.E. 1991. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J.* 10,2821.

Merrill, J.E.; Kutsunai, S.; Mohlstrom, C.; Hofman, F.; Groopman, J., Golde, D.W. 1984. Proliferation of astroglia and oligodendroglia in response to T-cell derived factors. *Science* 224,1428.

Merrill, J. 1987. Macrogliia: neural cells responsive to lympho kines and growth factors. *Immunology today* 8,146.

Merrill, J. 1990. Interleukin-2 effects in the central nervous system. *Ann NY Acad. Sci* 594,188.

Merrill, J., Jonakait, G.M. 1995. Interactions of the nervous and immune systems in development, normal brain homeostasis, and disease. *FASEB J.* 9,611.

Millar, D.B., Hough, C.J., Mazorow, D.L., Gootenberg, J.E. 1990. Beta-endorphin's modulation of lymphocyte proliferation is dose, donor, and time dependent. *Brain Behav. Immun.* 4,232.

Mitchell, M.D., Edwin, S.S., Silver, R.M., Romero, R.J. 1993. PotenciAl agonist action of the interleukin - 1 receptor antagonist protein: implications for the treatement of women. *J. Clin. Endo. Met.* 19,1386.

Moldawer, L.L., Andersen, C., Gelin, J., lundholm, K.G., 1988. Regulation of food intake and hepatic protein synthesis by recombinant derived cytokines. *Am. J. Physiol.* 257,G450.

Morganti-Kossmann, M.C.; Kossmann, T., Wahl, S.M. 1992. Cytokines and neuropathology. *TIPS* 13,286.

Muglia, L., Jacobson, L., Dikkes, P., Majzoub, J.A. 1995. Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature* 373:427

Munck, A., Guyre, P.M., Holbrook, N. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Rev.* 5,25.

Naito, Y., Fukata, J., Tominaga, T., Masui, Y., Murakami, N., Tamai, S., Mori, K., Imura, H. 1989. Adrenocorticotrophic hormone-releasing activities of interleukins in a homologous in vivo system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164,1262.

Navarra, P.; Tsagarakis, S.; Faria, M.S.; Rees, L.H.; Besser, G.M., Grossman, A.B. 1991. Interleukin-1 and -6 stimulate the release of corticotropin-releasing hormone-41 from rat hypothalamus in vitro via the eicosanoid cyclooxygenase pathway. *Endocrinol.* 128,37.

Nicklin, M.J., Weith, A., Duff, G.W. 1994. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and the interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics* 19,382.

Nishida, T., Nishino, N., Takano, M., Kawai, K., Bando, K., Masui, Y., Nakai, S., Hirai, Y. 1987. cDNA cloning of IL-1  $\alpha$  and IL-1  $\beta$  from mRNA of U937 cell line. *Biochem Biophys Res Comm* 143,345.

Ohlson, K., Bjork, P., Bergenfeldt, M., Hageman, R., Thompson, R.C. 1990. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature* 348,550-552.

Ohmichi, M., Hirota, K., Koike, K., Kurachi, K., Ohtsuka, S., Matsusaki, N., Yamaguchi, M., Miyake, A., Tanizawa, O. 1992. Binding sites for interleukin-6 in the anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 55,199.

Ohmori, Y., Strassman, G., Hamilton, T.A. 1990. cAMP differentially regulates expression of mRNA encoding IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 145,3333.

Okamoto, Y.; Minamoto, S.; Shimizu, K.; Mogami, H., Taniguchi, T. 1990. Interleukin-2 receptor chain expressed in an oligodendrogloma line binds interleukin-2 and delivers growth signal. *P.N.A.S. USA* 87,6584.

Okusaka, S., Gelfand, J.A., Ikejima, T., Connolly, R.J., Dinarello, C.A. 1988. Interleukin-1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J. Clin. Invest.* 81,1162.

Orth, D.N. 1992. Corticotropin-releasing hormone in humans. *Endocrine Rev.* 13,164.

Palacios, R., Sugawara, I. 1982. Hydrocortisone abrogates proliferation of T cells in autologous mixed lymphocyte reaction by rendering the interleukin-2 producer T cell unresponsive to interleukin 1 and unable to synthesize the T-cell growth factor. *Scand. J. Immunol.* 15,25.

Parant, M., Le Contel, C., Parant, F., Chedid, L. 1991. Influence of endogenous glucocorticoids on endotoxin-induced production of circulating TNF- $\alpha$ . *Lymphokine and Cytokine Res.* 10,265.

Parrillo, J.E., Fauci, A.S. 1978. Comparison of the effector cells in human spontaneous cellular cytotoxicity and antibody dependent cellular toxicity: differential sensitivity of effector cells to in vivo and in vitro corticosteroids. *Scand. J. Immunol.* 8,99.

Pawlikovsky, M., Zelazowski, P., Dohler, K., Stepien, H. 1988. Effects of two neuropeptides, somatoliberin (GRF) and Corticoliberin (CRF) on human lymphocyte natural killer activity. *Brain Behav. Immun.* 2,50.

Payne, L.C., Weigent, D.A. Blalock, J.E. 1994. Induction of pituitary sensitivity to interleukin-1: a new function for corticotropin-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198,480.

Perlstein, R.S., Whitnall, M.H., Abrams, J.S., Mougey, E.H., Neta, R. 1993. Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide. *Endocrinology* 132,946.

Plotzky, P.M., Sawchenko, P.E. 1987. Hypophysial portal plasma levels median eminence content and immunohistochemical staining of corticotropin-releasing factor, arginine vasopresin and oxytocin after pharmacological adrenalectomy. *Endocrinology* 120,1361.

Potter, E., Sutton, S., Donaldson, C, Chen, R., Perrin, M., Lewis, K., Sawchenko, P., Vale, W.W., 1994. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 91,8777.

Poutsika, D.D., Clark, B.D., Vannier, E., Dinarello, C.A. 1991. Production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 $\beta$  by peripheral blood mononuclear cells is differentially regulated. *Blood* 78, 1275.

Preistle, J.P., Schar, H.P., Grutter, M.G. 1988. Crystal structure of the cytokine interleukin-1 beta. *EMBO J.* 7,339.

Preistle, J.P., Schar, H.P., Grutter, M.G. 1989. Crystallographic refinement of interleukin-1 beta at 2.0 A resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86,9667.

Re, F., Muzio, M., De Rossi, M., Polentarutti, N., Mantovani, A., Colotta, F. 1994. The type II receptor as a decoy target for interleukin-1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. *J. Exp. Med.* 179,739.

Re, F., Muzio, M., De Rossi, M., Polentarutti, N., Giri, J.G., Mantovani, A., Colotta, F. 1994. The type II receptor as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. *J. Exp. Med.* 179,739.

Reed, J.C., Abidi, A.H., Alpers, A.H., Hoover, R.G., Robb, R.J., Nowell, P.C. 1986. Effect of cyclosporin A and dexamethasone on interleukin-2 receptor gene expression. *J. Immunol.* 137,150.

Reul, J.M.H.M., de Kloet, E.R. 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 121,2505.

Rinehart, J.; Zanjani, E.; Nomdedeu, B.; Gormus, B., Kaplan, M. 1978. Cell-cell interaction in erythropoiesis: role of human monocytes. *J. Clin. Invest.* 62,979.

Rivier, C., Vale, W., Brown, M. 1989. In the rat, Interleukin-1 a and b stimulate adrenocorticotropin and catecholamine release. *Endocrinology* 125,3096.

Rivier, C., Rivest, S. 1993. Mechanisms mediating the effect of cytokines on neuroendocrine functions in the rat. *Ciba Found. Symp.* 172,204.

Rossi, B. 1993. IL-1 transduction signals. *Eur. Cytokine Netw.* 4,181.

Salas, M., Evans, S., Levell, M., Whicher, J. 1989. In vitro effect of rIL-1 and rIL-6 on corticosterone release by isolated rat adrenal cells. Second International Workshop on Cytokines Hilton Head, USA. abstr. 263.

Saphier, D., Abramsky, O., Mor, G., Ovadia, H. Multiunit electrical activity in conscious rats during an immune response. *Brain Behav. Immun.* 1,40.

Sapolsky, R, Rivier, C., Yamamoto, G., Plotzky, P., Vale, W. 1987. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* 238,522.

Sasaki, A., Liotta, A.S., Luckey, M.M., Margioris, A.N., Suda, T., Krieger, D.T. 1984. Immunoreactive corticotropin-releasing factor is present in human maternal plasma during the third trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 59:812.

Sauer, J.; Stalla, G.K.; Muller, O.A., Arzt, E. 1994. Inhibition of interleukin 2 mediated lymphocyte activation in patients with cushing's syndrome: a comparison with hypocortisolemic patients. *Neuroendocrinology* 59,144.

Sauer, J., Arzt, E., Gumprecht, H., Hopfner, U., Stalla, G.K. 1994. Expression of interleukin-1 receptor antagonist in human pituitary adenomas in vitro. *J Clin Endo Metab* 79,1857.

Sauer, J., Castrén, M., Hopfner, U., Holsboer, F., Stalla, G.K., Arzt, E. 1995. Inhibition of lipopolysaccharide-induced monocyte interleukin-1 receptor antagonist synthesis by cortisol: involvement of the mineralocorticoid receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (en prensa).

Savino, W., Dardene, M. 1995. Immune-neuroendocrine interactions. *Immunol. Today* 16,318.

Scheinman, R.I., Cogswell, P.C., Lofquist, A.K., Baldwin, A.S. 1995. Role of transcriptional activation of I $\kappa$ B $\alpha$  in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270,283.

Scheithauer, B.W., Kovacs, K.T., Laws, E.R., Randall, R.V. 1986. Pathology of invasive pituitary tumors with special reference to functional classification. *J. Neurosurg.* 65,733.

Schindler, R., Clark, B.D., Dinarello, C.A. 1990. Dissociation between interleukin-1 $\beta$  mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* 265,10232.

Schöbitz, B., Van En Dobbela, M., Holsboer, F., Sutanto, W., De Kloet, E.R. 1993. Regulation of interleukin 6 gene expression in rat. *Endocrinology* 132,1569.

Screpanti, I., Morrone, S., Meco, D., Santoni, A., Gulino, A., Paolini, R., Crisanti, A., Mathieson, B.J., Frati, L. 1989. Steroid sensitivity of lymphocyte subpopulations during intrathymic differentiation. *J. Immunol.* 142,3378.

Sims, J.E., March, C.J., Cosman, D., Widmer, M.B., MacDonald, H.R., McMahan, C., Grubin, C.E., Wignall, J.M., Jackson, J.L., Call, S.M., Friend, D., Alpert, A.R., Gillis, S., Urdal, D.L., Dower, S.K. 1988. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 241,585.

Sims, J.E., Gayle, M.A., Slack, J.L., Aldersn. M.R., Bird, T.A., Giri, J.G., Colotta, F., Re, F., Mantovani, A., Shanebeck, K., Grabstein, K.H., Dower, S.K. 1993. Interleukin-1 signaling occurs exclusively via type I receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90,6155.

Singh, V.K., Warren, R.P., White, E.D., Leu, S.J. 1990. Corticotropin releasing factor induced stimulation of immune functions. *Ann. NY Acad. Sci.* 594,416.

Singh, V.K. 1989. Stimulatory effect of corticotropin releasing hormone on human lymphocyte proliferation and interleukin-2 receptor expression. *J. Neuroimmunol.* 23,257.

Singh, V.K., Fudenberg, H.H. 1988. Binding of <sup>125</sup>I corticotropin releasing factor to blood immunocytes and its reduction in Alzheimer's disease. *Immunol. Lett.* 18,5.

Smith, K.A., Crabtree, G.R., Kennedy, S.J., Munck, A.U. 1977. Glucocorticoid receptors and glucocorticoid sensitivity of mitogen stimulated and unstimulated human lymphocytes. *Nature* 267,523.

Smith, K.A., Lachman, L.B., Oppenheim, J.J., Favata, M.F. 1980. The functional relationship of the interleukins. *J. Exp. Med.* 151,1551.

Smith, K. 1988. Interleukin-2: inception, impact and implications. *Science* 240,1169.

Smith, D.R., Kunkel, S.L., Standiford, T.J., Chensue, S.W., Rolfe, M.W., Orringer, M.B., Whyte, R.I., Burdick, M.D., Danforth, J.M., Gilbert, A.R., Strieter, R.M. 1993. The production of interleukin-1 receptor antagonist by human bronchogenic carcinoma. *Am. J. Pathol.* 143,794.

Smith, E.M., Morrill, A.C., Meyer, W.J., Blalock, J.E. 1986. Corticotropin releasing factor induction of leukocyte-derive immunoreactive ACTH and endorphins. *Nature* 321,881.

Smith, L.R., Brown, S.L., Blalock, J.E. 1989. Interleukin-2 induction of ACTH secretion: presence of an interleukin-2 receptor chain like molecule on pituitary cells. *J. Neuroimmunol.* 21,249.

Smith, J., Urba, W., Steis, R., Janik, J., Fenton, B., Sharfman, W., Conlon, K., Sznol, M., Creekmore, S., Wells, N., Elwood, L., Keller, J., Hestdal, K., Ewel, C., Rossio, J., Kopp, W., Shimuzut, M., Oppenheim, J.J., Longo, D. 1990. Interleukin-1 alpha: results of a phase I toxicity and immunomodulatory trial. *Am. Soc. Clin. Oncol.* 9,917.

Snyers, L.; De Wit, L., Content, J. 1990. Glucocorticoid up-regulation of high affinity interleukin-6 receptors on human epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 2838.

Solomon, S. 1993. Corticostatins. *Tends. Endocrinol. Metab.* 4,260.

Spangelo, B.L., Judd, A.M., MacLeod, R.M., Goodman, D.W., Isakson, P.C. 1990. Endotoxin-induced release of interleukin-6 from rat medial basal hypothalamus. *Endocrinology* 127,1779.

Spangelo, B.L., MacLeod, R.M., Isakson, P.C. 1990. Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 126,582.

Spangelo, B.L., Isakson, P.C., MacLeod, R.M. 1990. Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells is stimulated by increased intracellular adenosine 3',5'-monophosphate and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 127, 403.

Spangelo, B.L., Judd, A.M., Isakson, P.C., MacLeod, R.M. 1991. Interleukin-1 stimulates interleukin-6 release from rat anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 128,2685.

Spangelo, B.L., Gorospe, W.C. 1995. Role of the cytokines in the neuroendocrine-immune system axis. *Front. Neuroendocrinol.* 16,1.

Spriggs, M.K., Lioubin, P.J., Slack, J., Dower, S.K., Jonas, U., Cosman, D., Sims, J.E., Bauer, J. 1990. Induction of an interleukin-1 receptor (IL-1R) on monocytic cells. Evidence that the receptor is not encoded by a T cell type IL-1R mRNA. *J. Biol. Chem.* 265,22499.

Stenzel, P., Kesterson, R., Yeung, W., Cone, R.D., Rittenberg, M.B., Stenzel-Poore, M.P. 1995. Identification of a novel murine receptor for corticotropin-releasing hormone expressed in the heart. *Mol. Endo.* 9,637.

Stenzel-Poore, M.P., Cameron, V.A., Vaughan, J., Sawchenko, P.E., Vale, W. 1992. Development of Cushing's syndrome in corticotropin-releasing factor transgenic mice. *Endocrinology* 130,3378.

Stephanou, A., Jessop, D.S., Knight, R.A., Lightman, S.L. 1990. Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *Brain Behav. Immun.* 4,67.

Sternberg, E., 1989. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in an experimental model of arthritis. *Psychoneuroendocrinology* 2,102.

Sternberg, E., Scott Young, W., Bernardini, R., Calogero, A., Chrousos, G., Gold, P., Wilder, R. 1989. A central nervous system defect in biosynthesis of CRH is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 4771.

Sundar, S.L., Becker, K.J., Cierpial, M.A., Carpenter, M.D., Rankin, L.A., Fleener, S.L., Ritchie, J.C., Simpson, J.C., Weiss, J.M. 1989. Intracerebroventricular injection of interleukin-1 rapidly decreases peripheral cellular immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86,6398.

Sundar, S.K., Cierpial, M.A., Kits, C., Ritchie, J.C., Weiss, J.M. 1990. Brain IL-1 induced immunosuppression occurs through activation of both pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system by corticotropin-releasing factor. *J. Neurosci.* 10,3701.

Swingle, W. W., Remington, J. W. 1944. Role of adrenal cortex in physiological processes. *Physiol. Rev.* 24, 89.

Takao, T., Tracey, D.E., Mitchell, W.M., De Souza, E.B. 1990. Interleukin-1 receptors in mouse brain: characterization and neuronal localization. *Endocrinology* 127,3070.

Takao, T., Culp, S., Newton, R.C., De Souza, E. 1992. Type I interleukin-1 receptors in the mouse brain-endocrine-immune axis labelled with <sup>125</sup>I recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *J. Neuroimmunol.* 41,51.

Takao, T., Culp, S., De Souza, E., 1993. Reciprocal modulation of interleukin-1  $\beta$  and IL-1 receptors by lipopolysaccharide treatment in the mouse brain-endocrine-immune axis. *Endocrinology* 132,1497.

Tennenbaum, C.S., Hamilton, T.A. 1989. Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine peritoneal macrophages is selectively suppressed by agents that elevate intracellular cAMP. *J Immunol* 142:1274.

Tewari, A., Buhles, W.C., Starnes, H.F. 1990. Preliminary report: Effects of interleukin-1 on platelet counts. *Lancet* 336,712.

Theodorou, V., Fioramonti, J., Bueno, L. 1993. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist protein prevents sensitization and intestinal anaphylaxis in guinea pigs. *Life. Sci.* 53,733.

Tobler, A.; Meier, R.; Seitz, M.; Dewald, B.; Baggiolini, M., Fey, M. F. 1992. Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8 and IL-6, but not of M-CSF in human fibroblasts. *Blood.* 79, 45.

Trapp, T., Rupprecht, R., Castrén, M., Reul, J.M.H.M., Holsboer, F. 1994. Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the sistema nervioso central. *Neuron* 13, 1457.

Truss, M., Beato, M. 1993. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr. Rev.* 14, 459.

Tsagarakis, S., Gillies, G., Rees, L.H., Besser, M., Grossman, A. 1989. Interleukin-1 directly stimulates the release of corticotropin-releasing factor from rat hypothalamus. *Endocrinology.* 121,1580.

Tsagarakis, S., Grossman, A. 1994. Corticotropin-releasing hormone: interactions with the immune system. *Neuroimmunomodulation* 1:329.

Turner, M., Chantry, D., Katsikis, P., Berger, A., Brennan, F.M., Feldmann, M. 1991. Induction of the interleukin-1 receptor antagonist protein by transforming growth factor- $\beta$ . *Eur. J. Immunol.* 21,1635.

Uehara, A., Gottschal, P.E., Dahl, R.R., Arimura, A. 1987. Interleukin-1 stimulates ACTH release by an indirect action which requires endogenous corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 121,1580.

Ulich, T. R., Guo, K., Yin, S., del Castillo, J., Yi, E. S., Thompson, R. C., Eisenberg, S. P. 1992. Endotoxin-induced cytokine gene expression *in vivo*. IV. Expression of interleukin-1  $\alpha/\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist mRNA during endotoxemia and during endotoxin-initiated local acute inflammation. *Am. J. Pathol.* 141, 61.

Vacca, A., Felli, M., Farina, A., Martinotti, S., Maroder, M., Screpanti, I., Meco, D., Petrangeli, E., Frati, L., Gulino, A. 1992. Glucocorticoid receptor-mediated

suppression of the interleukin-2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. *J.Exp.Med.* 175,637.

Vamvakopoulos, N.C., Chrousos, G.P. 1994. Hormonal regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression: implications for the stress response and immune/inflammatory reaction. *Endocrine . Rev.* 15,409.

Vankelecom, H., Carmeliet, P., Van Damme, J., Billau, A., Deneef, C. 1989. Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotipic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology* 49,102.

Velasco, S.; Tarlow, M.; Olsen, K.; Shay, J.; McCracken, G., Nisen, P. 1991. Temperature dependent modulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-1 and tumor necrosis factor expression in cultured human astroglial cells by dexamethasone and indometacin. *J. Clin. Invest.* 87,1674.

Veldhuis, H.D., van Koppen, C., van Ittersum, M., de Kloet, E.R. 1982. Specificity of the adrenal steroid receptor system in the rat hippocampus. *Endocrinology* 110,2044.

Velkeniers, B., D'Haens, G., Smets, G., Vergani, P., Vanhaelst, L., Hooghe-Peters, E.L. 1991. Expression of IL-6 mRNA in corticotroph cell adenomas. *J. Endocrinol. Invest.* 14 (suppl. 1) 31.

Velkeniers, B., Vergani, P., Trouills, J., D'Haens, G., Hooghe, R.J., Hooghe-Peters, E.L. 1994. Expression of IL-6 mRNA in normal rat and human pituitaries and in human pituitary adenomas *J Histochem Cytochem* 42,67.

Waage, A.; Slupphaug, G., Shalaby, R. 1990. Glucocorticoids inhibit the production of IL-6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts. *Eur. J. Immunol.* 20,2439.

Wahl, S. M., Costa, G. L., Corcoran, M., Wahl, L. M., Berger, A. E. 1993. Transforming growth factor- $\beta$  mediates IL-1-dependent induction of IL-1 receptor antagonist. *J. Immunol.* 150, 3553.

Wakabayashi, G, Gelfand, J.A., Jung, W.K., Connolly, R.J., Burke, J.F., Dinarello, C.A. 1991. Staphylococcus epidermis induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. *J. Clin. Invest.* 87,1925.

Walev, I., Reske, K., Palmer, M., Valeva, A., Bhakdi, S. 1995. Potassium-inhibited processing of IL-1 $\beta$  in human monocytes. *EMBO J.* 14,1607.

Warner, S.J.C., Auger, K.R., Libby, P. 1987. Interleukin-1 induces interleukin-1. II. Recombinant human interleukin-1 induces interleukin-1 production by adult human vascular endothelial cells. *J. Immunol.* 139,1911.

Webster, E.L., Battaglia, G., De Souza, E. B. 1989. Functional corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in mouse spleen: evidence from adenylate cyclase studies. *Peptides* 10,395.

Webster, E.L., Tracey, D.E., Jutila, M.A., Wolfe, S.A., De Souza, E.B. 1990. Corticotropin releasing factor receptors in mouse spleen: identification of receptor bearing cells as resident macrophages. *Endocrinology* 127,440.

Webster, J., Bevan, J.S., Ham, J., Horn, C.D., Scanlon, M.F. 1991. Growth factors production by human pituitary tumors. In: Pituitary adenomas, New trends in basic and clinical research (Eds. G.Faglia, P.Beck-Peccoz, B.Ambrosi, P.Travaglini and A.Spada) p. 103.

Wick, G., Schwarz, S., Kroemer, G. 1993. Immunoendocrine communication via the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in autoimmune diseases. *Endocrine. Rev.* 14,539.

Wick, G., Brezinschek, H.P., Hala, K., Dietrich, H., Wolf, H., Kroemer, G. 1989. The Obese strain (OS) chickens: an animal model with spontaneous autoimmune thyroiditis. *Adv. Immunol.* 47,433.

Willis, S., Nisen, P. 1995. Inhibition of lipopolysaccharide-induced IL-1 $\beta$  transcription by cyclic adenosine monophosphate in human astrocytic cells. *J Immunol* 154:1399.

Wong, H. L., Costa, G. L., Lotze, M. T., Wahl, S. M. 1993. Interleukin (IL) 4 differentially regulates monocyte IL-1 family gene expression and synthesis in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 177, 775.

Woodruff, J., Gesner, B.M. 1981. Lymphocytes: circulation altered by trypsin. *Science* 161,176.

Yamaguchi, M., Matsuzaki, N., Hirota, K., Miyake, A., Tanizawa, O. 1990. Interleukin-6 possibly induced by interleukin-1 $\beta$  in the pituitary gland stimulates the release of gonadotropins and prolactin. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 122,201.

Yin, M., Gopal, V., Banavali, S., Gartside, P., Preisler, H. 1992. Effects of an IL-1 receptor antagonist on acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 6,898.

Yoo, J., Stone, R.T., Kappes, S.M., Beattie, C.W. 1994. Linkage analysis of bovine interleukin 1 receptor types I and II (IL-1RI, II). *Mammal. Genome* 5,820.

  
MARCELO PAZ PEREDA

  
FOURNIER ARRET



Buenos Aires, 20 de Noviembre de 1995

Sres.  
Subcomisión de Doctorado  
FCEyN - UBA

De mi mayor consideración:

Por medio de la presente hago constar que el Lic. Marcelo Páez Pereda ha concluido satisfactoriamente su tesis doctoral. Ha realizado correctamente todos los experimentos propuestos. Durante todo el período ha completado su formación académica no solamente con los cursos aprobados sino también con la lectura y discusión permanente de trabajos científicos y de sus resultados experimentales.

Saluda a Uds. muy atentamente,



Prof. Eduardo Arzt

**Dr. EDUARDO ARZT**  
PROFESOR ADJUNTO  
F.C.E.N. - Univ. de Bs. As.

que modulan la actividad de ambos sistemas. Todas estas características de las interacciones entre ambos sistemas pueden encontrarse afectadas en asociación con diversas patologías y por lo tanto constituyen puntos interesantes para encarar la investigación de nuevas terapias y comprender mejor los mecanismos de acción de las ya conocidas.