

## Tesis de Posgrado

# Interacciones entre el sistema neuroendócrino y el sistema inmune en un modelo animal con el eje hipotalámico-pituitario-adrenal hiperactivo

Labeur, Marta Susana

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:**

Labeur, Marta Susana. (1995). Interacciones entre el sistema neuroendócrino y el sistema inmune en un modelo animal con el eje hipotalámico-pituitario-adrenal hiperactivo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2799\\_Labeur.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2799_Labeur.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Labeur, Marta Susana. "Interacciones entre el sistema neuroendócrino y el sistema inmune en un modelo animal con el eje hipotalámico-pituitario-adrenal hiperactivo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2799\\_Labeur.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2799_Labeur.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Interacciones entre el sistema neuroendócrino y el sistema  
inmune en un modelo animal con el eje hipotalámico-  
pituitario-adrenal hiperactivo**

**Marta S. Labeur**

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

Director: Dr. J.M.H.M Reul

Co-director: Dr. E. Arzt

INSTITUTO MAX PLANCK DE PSIQUIATRIA  
Departamento de Neuroendocrinología, Instituto Clínico

Director: Prof. Dr. Dr. F. Holsboer

Munich, Alemania

Año 1995

172

## **Agradecimientos**

Al Prof. Dr. Dr. Holsboer por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en el Instituto Max Planck.

A Hans por el apoyo, las enseñanzas, las ideas y los consejos brindados. Por las discusiones enriquecedoras, por los encuentros a las 7 de la mañana bajo el lema "Bitte Ruhe, Experiment", y por la valoración de mi trabajo.

A Archie por su ayuda incondicional, el seguimiento intensivo del trabajo de tesis, las críticas constructivas y enseñanzas. Por su preocupación y su confianza. Por abrirme la puerta al mundo alemán.

A mis compañeros de trabajo por el apoyo y la calidez brindados. Por la increíble atmósfera dentro y fuera del trabajo. Por las pizzas de todos los viernes. A Andreas, Elfie, Gita y Monika por las innumerables e invaluable charlas. A Charly por estar siempre presente, para lo que fuere. A Philipp por los encuentros enriquecedores. A Ilona, Sabine, Sharada y Thomas porque sí.

A todos los que me enseñaron y me ayudaron a la realización de mi tesis. Especialmente a Charlotte Conzelmann, Martin y Monika, por su ayuda experimental. A Elfie por su ayuda administrativa y su paciencia con mi alemán. A Renate por mantener el laboratorio como un laboratorio debe ser. A Jan por su contribución en los métodos de trabajo. A Astrid por hacer de la estadística algo entendible. Al Dr. Klinkert y Alexander por hacer posible mi trabajo en Martinsried. A Bettina por el perfecto trabajo de fotografía. A Cornelia por su constante ayuda en el mundo del halotano. A Joachim por alentarme en cada momento y por su invaluable paciencia, especialmente en el campo de la computación. A Paula por su toque en el castellano.

A los que hicieron posible la realización de esta experiencia increíble: Joachim, papá Labeur y Dorita.

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. El sistema inmune.....	2
1.1.1. La respuesta inmune.....	2
1.1.2. Las interleuquinas .....	3
1.1.2.1. Interleuquina 1 .....	5
1.1.2.2. Interleuquina 2.....	7
1.1.3. Subgrupos de células T CD4+ .....	8
1.2. El eje hipotalámico-pituitario-adrenal.....	9
1.3. Efectos del sistema inmune sobre el sistema neuroendócrino.....	12
1.3.1. Las citoquinas y el eje HPA .....	13
1.3.1.1. Interleuquina 1 .....	13
1.3.1.2. Interleuquina 6 y TNF- $\alpha$ .....	15
1.3.1.3. IFN e interleuquina 2 .....	15
1.3.2. Las citoquinas y el SNC .....	16
1.3.3. El sistema inmune y la actividad simpática.....	17
1.4. Expresión de citoquinas y sus receptores en el sistema neuroendócrino.....	19
1.5. Efectos del eje HPA sobre la respuesta inmune.....	21
1.5.1. Los glucocorticoides y el sistema inmune.....	21
1.5.1.1. Receptores de glucocorticoides en el sistema inmune.....	21
1.5.1.2. Los glucocorticoides y las células inmunes.....	22
1.5.1.3. Los glucocorticoides y las citoquinas .....	24
1.5.1.4. Los glucocorticoides y los receptores de citoquinas.....	25
1.5.2. La ACTH y el sistema inmune .....	26
1.5.3. La CRH y el sistema inmune.....	27
1.5.4. El eje HPA y la respuesta inmune: estudios <i>in vivo</i> .....	28
1.6. Resumen.....	30
<b>2. Objetivos de la investigación.....</b>	<b>31</b>
2.1. Modelo experimental.....	31

2.2. Objetivos generales.....	31
2.3. Objetivos específicos.....	32
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>33</b>
3.1. Modelo experimental <i>in vivo</i> .....	33
3.1.1. Animales.....	33
3.1.2. Infusión crónica icv .....	33
3.1.2.1. Minibomba osmótica.....	33
3.1.2.2. Implantación de la minibomba.....	34
3.1.2.3. Sustancias infundidas icv.....	35
3.1.3. Adrenalectomía .....	36
3.1.4. Protocolos experimentales <i>in vivo</i> .....	36
3.1.5. Experimentos neuroendócrinos.....	38
3.2. Cultivos celulares.....	38
3.2.1. Obtención de esplenocitos.....	38
3.2.2. Determinación del número de células.....	39
3.2.3. Determinación de la viabilidad celular .....	39
3.2.4. Condiciones de cultivo celular .....	40
3.2.5. Separación de macrófagos.....	40
3.2.6. Estimulación de las células y tiempos de cultivo celular.....	41
3.3. Ensayo de proliferación.....	42
3.4. Análisis por inmunofluorescencia.....	43
3.5. Determinación de hormonas y citoquinas.....	44
3.5.1. Corticosterona .....	44
3.5.2. ACTH.....	44
3.5.3. IL-2.....	45
3.6. Métodos de biología molecular.....	45
3.6.1. Preparación de bacterias competentes.....	45
3.6.2. Transformación y crecimiento bacteriano .....	46
3.6.3. Aislamiento del ADN .....	47
3.6.3.1. Aislamiento del ADN plasmídico.....	47
3.6.3.2. Escisión enzimática del ADN.....	49

3.6.3.3. Corrida en gel de agarosa del ADN para la separación y aislamiento del fragmento deseado.....	50
3.6.3.4. Extracción y concentración del ADN .....	51
3.6.4. Reacciones enzimáticas en el ADN .....	52
3.6.4.1. Marcación <i>in vitro</i> del ADN mediante $\alpha$ - <sup>32</sup> P-dCTP.....	52
3.6.4.2. Marcación con $\gamma$ - <sup>32</sup> P-UTP a través del método de transcripción <i>in vitro</i> .....	53
3.6.5. Aislamiento y análisis del ARNm de células.....	53
3.6.5.1. Aislamiento del ARN total .....	53
3.6.5.2. Separación del ARN en gel de agarosa.....	54
3.6.5.3. Transferencia del ARN del gel de agarosa a membranas de Nylon.....	56
3.6.5.4. Hibridización del ARN unido a la membrana.....	57
3.7. Análisis estadístico de los resultados .....	59
<b>4. Resultados.....</b>	<b>60</b>
4.1. Concentración óptima de CRH.....	60
4.2. Efectos de la infusión crónica icv de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l/hora de CRH en ratas sacrificadas en el día 7 del período de infusión.....	62
4.2.1. Ratas no adrenalectomizadas .....	62
4.2.1.1. Hormonas del eje HPA.....	62
4.2.1.2. Parámetros físicos.....	64
4.2.1.3. Proliferación de esplenocitos <i>in vitro</i> .....	65
4.2.1.4. Subpoblaciones de células T .....	65
4.2.1.5. Producción de IL-2 y del IL-2R $\alpha$ <i>in vitro</i> .....	66
4.2.1.6. Expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ en esplenocitos y macrófagos.....	73
4.2.2. Ratas adrenalectomizadas por 7 días.....	77
4.2.2.1. Proliferación de esplenocitos <i>in vitro</i> .....	77
4.2.2.2. Producción de la IL-2 <i>in vitro</i> .....	77
4.2.2.3. Expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ en esplenocitos.....	79
4.2.3. Ratas adrenalectomizadas por 1 día.....	81
4.2.3.1. Proliferación de esplenocitos <i>in vitro</i> .....	81
4.2.3.2. Producción de IL-2 <i>in vitro</i> .....	82
4.3. Efectos de la infusión crónica icv de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l/hora de CRH en ratas sacrificadas después del período de infusión .....	83

4.3.1. Hormonas del eje HPA .....	83
4.3.2. Parámetros físicos.....	85
4.3.3. Proliferación de esplenocitos y producción de IL-2 y del IL-2R $\alpha$ <i>in vitro</i> .....	87
4.3.3.1. 1 día post-bombeo .....	87
4.3.3.2. 2 días post-bombeo .....	90
4.3.3.3. 7 días post-bombeo .....	90
4.3.3.4. Proliferación de esplenocitos y producción de IL-2 en función del tiempo.....	95
4.3.4. Expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ en esplenocitos.....	97
<b>5. Discusión .....</b>	<b>100</b>
5.1. Hormonas del eje HPA .....	100
5.2. Parámetros físicos.....	103
5.3. Parámetros inmunes .....	104
5.3.1. Proliferación de esplenocitos <i>in vitro</i> .....	105
5.3.2. Producción de IL-2 y del IL-2R $\alpha$ <i>in vitro</i> .....	108
5.3.3. Expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ .....	111
<b>6. Conclusiones de la presente investigación.....</b>	<b>115</b>
<b>7. Referencias.....</b>	<b>116</b>
<b>8. Publicaciones relacionadas con el tema.....</b>	<b>137</b>

## Abreviaturas

ACTH	adrenocorticotrofina
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN copia
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina trifosfato
AVP	arginina-vasopresina
CD	cluster de diferenciación
CMPS	células mononucleares periféricas sanguíneas
cpm	cuentas por minuto
Con A	concanavalina A
CRH	hormona liberadora de corticotrofina
CTP	citocina trifosfato
DHEA	dehidroepiandrosterona
DO	densidad óptica
EAE	encefalomielitis alérgica experimental
ES	error estándar
FBS	suero fetal bovino
G-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	factor estimulante de colonias de macrófagos y de granulocitos
GTP	guanosina trifosfato
HPA	hipotalámico-pituitario-adrenal
icv	intracerebro-ventricular
IFN	interferón
IL	interleuquina
IL-2R $\alpha$	cadena alpha del receptor de IL-2
ip	intraperitoneal
iv	intravenoso



kb	kilobases
k <sub>d</sub>	constante de disociación
LEW/N	cepa de ratas Lewis
LPS	lipopolisacárido bacteriano (endotoxina)
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
NK	"natural killer"
P	nivel de significación
PHA	Phytohaemagglutinin
pb	pares de bases
PBS	buffer salino fosfato
POMC	proopiomelanocortina
R	receptor
RG	receptor de glucocorticoides
RM	receptor de mineralocorticoides
rpm	revoluciones por minuto
SNC	sistema nervioso central
SP	sustancia P
TcR	receptor de células T
Th	T "helper "
TNF	factor de necrosis tumoral
TSH	hormona estimulante de la glándula tiroides
TTP	timosina trifosfato
vs.	versus

## 1. Introducción

Distintos mecanismos de autorregulación confieren al sistema inmune cierto grado de autonomía. Sin embargo, los procesos inmunes, operan de una manera coordinada con el resto de los sistemas presentes en el organismo. Ejemplos claros puntualizan las interacciones regulatorias entre el sistema neuroendócrino y el sistema inmune. La función de las células del sistema inmune puede ser modulada por hormonas, neurotransmisores, neuropéptidos y por alteraciones en las funciones cerebrales. Paralelamente, productos derivados del sistema inmune, como las linfoquinas y las monoquinas, pueden afectar a los mecanismos centrales, autonómicos y endócrinos. Estas interacciones no se limitan a una modulación recíproca sino que constituyen mecanismos funcionales imprescindibles para el funcionamiento óptimo de ambos sistemas y dan como resultado el mantenimiento de la homeostasis

Numerosas respuestas neuroendócrinas ocurren durante la activación del sistema inmune. Dichas respuestas, pueden ser generadas por antígenos inocuos o durante condiciones patológicas que implican la activación inmune; y en muchos casos se las puede disociar de los efectos de la enfermedad misma o del estrés causado por la enfermedad. Las linfoquinas y las monoquinas actúan como mensajeros capaces de transmitir la información del estado en que se encuentra el sistema inmune hacia estructuras nerviosas y endócrinas.

Diversos estudios detallan las señales autorregulatorias que controlan la respuesta inmune, sin embargo, aún queda mucho por conocer acerca de las interacciones entre las células inmunes y sus productos, con el resto de los sistemas presentes en el organismo, y las consecuencias de dichas interacciones en los mecanismos intrínsecos y extrínsecos al sistema inmune.

Se detallan en las próximas secciones, la relevancia de las interacciones neuroendócrinas-inmunes para la regulación del sistema inmune como también, el rol activo del sistema inmune en la mediación de ajustes metabólicos, homeostáticos y de trastornos causados durante el curso de ciertos procesos infecciosos, inflamatorios o tumorales. Asimismo se describen redes neuroendócrinas-inmunes complejas que se hacen presentes durante condiciones tanto fisiológicas como patológicas.

A lo largo de la introducción se describen el sistema inmune, el eje HPA, las interacciones entre ambos sistemas y las vías neuroendócrinas-inmunes.

---

## **1.1. El sistema inmune**

### **1.1.1. La respuesta inmune**

Dentro del sistema inmune, una red celular compleja media múltiples procesos como el reconocimiento de antígenos propios y no propios, la eliminación de patógenos foráneos, la neutralización de toxinas y la exterminación de tumores celulares. Una característica particular del sistema inmune es su especificidad: el reconocimiento celular específico de millares de antígenos foráneos. Dicha especificidad es debida a dos tipos celulares: las células T y las células B. Las bases moleculares de dicha especificidad residen en los receptores presentes en cada célula.

Los linfocitos T son los responsables tanto de las reacciones inmunes mediadas por células como de la coordinación de la activación funcional de otros tipos celulares, entre los cuales se incluyen las células B. Presentan moléculas de reconocimiento para el agente infeccioso, el TcR, el cual está constituido por proteínas de superficie celular.

Las células B son células efectoras. Producen y secretan moléculas de inmunoglobulinas (anticuerpos) específicas para el antígeno, las cuales median la inmunidad humoral. Los linfocitos B también presentan inmunoglobulinas en su superficie las cuales actúan como receptores específicos de antígenos.

Una tercera clase de células que no poseen ninguna especificidad para el reconocimiento del antígeno, pero que sin embargo juegan un rol crucial en el funcionamiento del sistema inmune, son las células macrofágicas. Los macrófagos participan en procesos de presentación de antígeno a las células T. Ellos posibilitan entonces, el reconocimiento por parte de los linfocitos T de las proteínas antigénicas y proveen de señales extracelulares a ambos linfocitos, las cuales son requeridas para la activación funcional de los mismos. En el caso de una infección bacteriana, uno de los eventos iniciales es la fagocitosis de las células bacterianas por parte de los macrófagos. Luego de este proceso de internalización, las bacterias son degradadas por las enzimas lisosomales y los péptidos, así generados, son presentados sobre la superficie celular en asociación con el MHC clase II. Otras células, entre ellas, las células B y las células dendrítica, funcionan también como células presentadoras de antígenos, una vez que el antígeno es procesado en péptidos más pequeños.

Los linfocitos y los macrófagos son parte de las células presentes en la sangre y se desarrollan a partir de células pluripotenciales hematopoiéticas provenientes

de la médula ósea. La diferenciación y el crecimiento de las células sanguíneas es un proceso dinámico que debe ser mantenido continuamente en el adulto debido al continuo recambio de estas células. El sistema hematopoiético responde, además, a situaciones agudas como una infección o la pérdida de sangre. Así, mecanismos regulatorios específicos son necesarios para el control de dicho proceso.

Las células T pueden ser subdivididas dentro de dos subtipos, presentando ambos, receptores específicos para el antígeno en la superficie celular. El primer subtipo, las células citotóxicas, cuyo marcador leucocitario de superficie es el CD8, pueden destruir células infectadas por virus. En este caso, el TcR reconoce al antígeno en asociación con el MHC clase I. El segundo subtipo, las células Th, (CD4<sup>+</sup>), colaboran no sólo con los T citotóxicos sino también con las células B en la producción y en la secreción de moléculas de inmunoglobulinas, las cuales pueden unirse a moléculas de antígenos. El TcR, en dicho caso, reconoce antígenos en asociación con las moléculas MHC clase II. Luego de la presentación de un péptido en el contexto del MHC clase II, las células con el TcR apropiado para el antígeno específico serán las capaces de reconocer el péptido en un proceso que requiere la expresión del CD4. La activación del TcR de las células T CD4<sup>+</sup> específicas para el antígeno resulta en un proceso de traducciones de señales en el cual un complejo de proteínas asociadas al receptor, llamadas CD3, está involucrado. El primer evento intracelular es la interacción del complejo TcR/CD3 con la "GTP-binding protein". Posteriormente, la subunidad alpha de la proteína se une al GTP y activa a la fosfolipasa C. Esto resulta en la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato unido a la membrana, con la formación de inositol trifosfato y diacilglicerol. El inositol trifosfato es responsable de la movilización del calcio citoplasmático desde el retículo endoplásmico, mientras que el diacilglicerol activa a la proteína kinasa C. Estos segundos mensajeros, a su vez, constituyen un prerrequisito para la subsecuente expresión de genes requeridos por la célula T para entrar en el ciclo celular (Szamel et al., 1995).

### **1.1.2. Las interleuquinas**

La expresión de ciertos factores proteicos solubles, llamados citoquinas o interleuquinas, es necesaria para el fenómeno de proliferación celular, por ej., la IL-2 para las células T o la IL-4, para las células B. Estas linfoquinas no sólo funcionan como factores de crecimiento y de diferenciación (tabla 1) sino

**Tabla 1.** Propiedades funcionales de las citoquinas (tabla modificada de Abraham, 1991)

Citoquinas	Acciones
IL-1	inducción de las proteínas de la fase aguda, inducción de fiebre, activación de células T, co-factor en la 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, estimulación de la hematopoesis <i>in vivo</i> , inducción de hipotensión
IL-2	estimulación de la actividad de los NK, 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
IL-3	estimulación de la actividad de los eosinófilos, estimulación de la diferenciación de las células B, estimulación de la hematopoesis <i>in vivo</i>
IL-4	activación de macrófagos, activación de células B, estimulación de la proliferación y de la diferenciación de células B, inducción de receptores de IgE en células B, activación de células T, estimulación de la proliferación células T
IL-5	estimulación de la actividad de los eosinófilos, activación de células B, estimulación de la selección de isotipos (IgA)
IL-6	inducción de las proteínas de la fase aguda, estimulación de la diferenciación de células B, activación de células T, estimulación de la proliferación y de la diferenciación de células T,
TNF- $\gamma$	activación de macrófagos, estimulación de neutrófilos, estimulación de la proliferación de células T, inducción quimiotáctica de la migración de células, inducción de fiebre, inducción de hipotensión, inducción de las proteínas de la fase aguda
IFN- $\gamma$	inducción de fiebre, inducción de las proteínas de la fase aguda, estimulación de la selección de isotipos (IgG2a), inhibición de la activación de células B, estimulación de la proliferación y de la diferenciación de células B, activación de macrófagos

también como proteínas inmunorregulatorias. La interacción entre los linfocitos B, T y los macrófagos, ocupa un rol esencial dentro de la respuesta inmune. La coordinación de dicha interacción se efectúa, también, mediante citoquinas (figura 1). Las células T son la mayor fuente de producción de dichos factores. Los macrófagos y las células B, producen otras citoquinas o comparten la

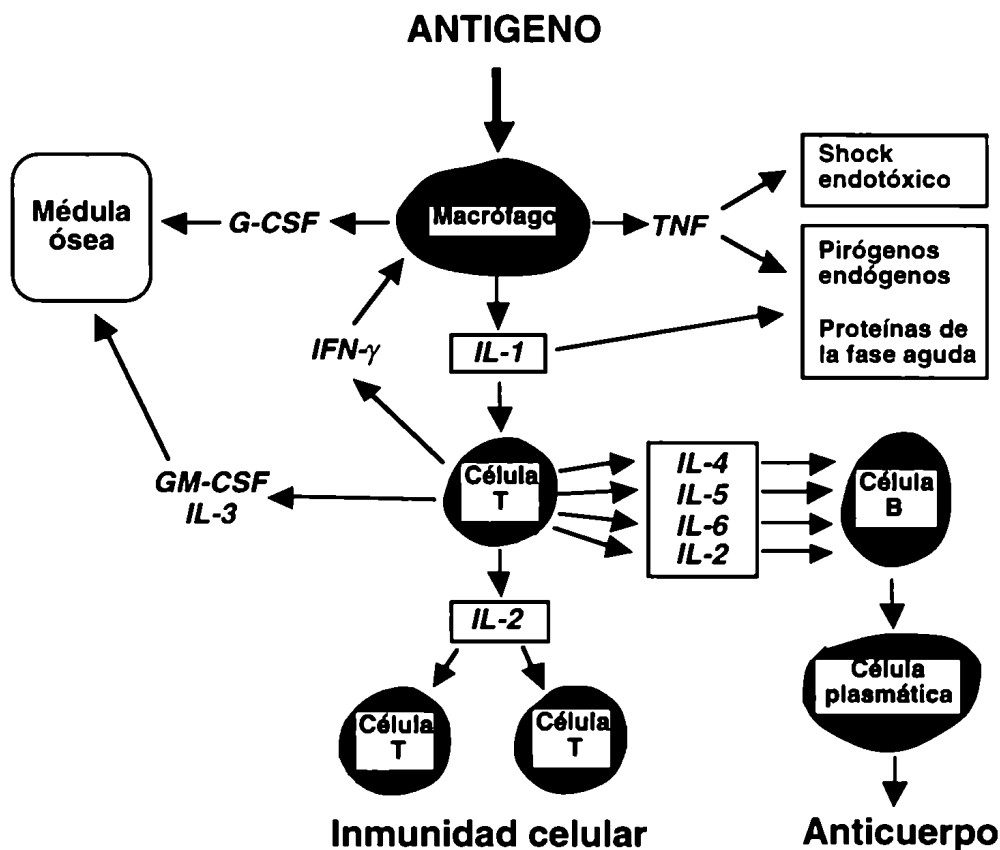
producción de algunas de ellas con los linfocitos T. Todas las citoquinas conocidas hasta el momento son polipéptidos o glicoproteínas, las cuales, a diferencia de las inmunoglobulinas, no tienen especificidad por el antígeno. Algunas citoquinas forman oligómeros de alto peso molecular. Hasta el presente, sólo la IL-12 se presenta como un heterodímero (Vilcek & Le, 1994). Estas linfoquinas, secretadas luego de la activación de cada una de dichas células, actúan sobre otros tipos celulares independientemente de la especificidad del antígeno. Por ej., algunos de estos factores presentan actividad quimiotáctica para otros neutrófilos y macrófagos y pueden también activar a dichas células para producir sus propios mediadores. De este modo, un estímulo antigénico inicial puede llevar a una amplia activación celular, independientemente de la especificidad de antígeno, y puede resultar así en reacciones inflamatorias que aumentan la respuesta de las células inmunes.

La inmunidad mediada por células puede ser modulada en dos estadios: en la activación de los genes de las citoquinas o en la fase efectora la cual involucra la interacción de la citoquina con su receptor.

#### *1.1.2.1. Interleuquina 1*

La IL-1 es una citoquina, con propiedades pleiotrópicas, responsable de mediar una variedad de procesos involucrados en la defensa del organismo, fenómenos de inflamación y respuesta a daños tisulares. Aunque fue descrita como un producto derivado de células macrofágicas, se ha detectado en una variedad de tipos celulares, por ej. en fibroblastos, queratinocitos de la piel, linfocitos T y B, astrocitos cerebrales y células de la microglía. Consiste en dos moléculas distintas pero relacionadas: la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ . Ambas moléculas reconocen y se unen al mismo receptor de superficie celular. La IL-1 fue inicialmente caracterizada como un pirógeno endógeno, capaz de inducir fiebre cuando es administrada en animales (Atkins, 1960). Su función como regulador inmunológico fue sugerida por su actividad como factor activador de timocitos. La IL-1 tiene también propiedades como factor activante de hepatocitos y media la inducción de las proteínas de la fase aguda en el hígado (Gauldie et al., 1987). Aparece ocupando un rol primario en reacciones de inflamación a través de la inducción de metabolitos inflamatorios. Induce la producción de prostaglandina E<sub>2</sub>, collagenasa, y de fosfolipasa A<sub>1</sub> (Dejana et al., 1987). 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. Participa también en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, por ej. en la artritis, donde es encontrada en el fluido sinovial de las articulaciones que presentan la enfermedad. La IL-1 media indirectamente otros procesos, actuando sobre otras células, e induciéndolas a producir sus propios factores de crecimiento. Entre otros, muchos de los procesos por los cuales la IL-1 fue descrita, aparecen ahora debidos a la IL-6, cuya inducción es mediada por la IL-1. Un ejemplo de ello lo constituye la diferenciación de los linfocitos B inducida por la IL-6. Es agrupada junto con el TNF y la IL-6 como factores que median efectos comunes, debido a que presentan actividades similares y a sus similares patrones de producción. La IL-1 coopera con otras citoquinas, como la IL-4, en la activación de las células B, tanto para fenómenos de proliferación,



**Figura 1.** Propagación de la respuesta inmune celular y humoral mediante la red de citoquinas (modificado de Munck et al., 1990).

---

como para la secreción de inmunoglobulinas (Falkoff et al., 1984). Como producto de los macrófagos, la IL-1 juega un rol importante en la activación de los linfocitos T. Una vez que el TcR reconoce al antígeno en el contexto MHCII, 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 de IL-2R por dichos linfocitos T (Smith et al., 1980).

#### 1.1.2.2. *Interleuquina 2*

La IL-2 fue originalmente descrita como una linfoquina producida por linfocitos humanos estimulados por mitógenos o por antígenos presentes en un medio condicionado. Dicha citoquina aumenta la mitogénesis de los timocitos y mantiene el crecimiento de líneas de células T *in vitro* (Robb, 1984). Linfoquinas exhibiendo dicha actividad fueron caracterizadas en diversas especies, incluyendo el humano (Mier & Gallo, 1980), el ratón (Shaw et al., 1978), la rata (Gillis et al., 1980) y el pollo (Shnetzler et al., 1983). Esta linfoquina es secretada principalmente por células Th, 4 a 12 horas luego de la estimulación por unión del antígeno al TcR. La unión de la IL-2 al IL-2R, presente en los linfocitos T, resulta en la proliferación de estas células, el aumento en la secreción de linfoquinas, de la expresión de receptores de membrana para otros factores de crecimiento (por ej. el receptor de transferrina y de insulina), y la expresión de MHC clase II. La IL-2, como factor de crecimiento de células T, induce la proliferación de las mismas células T productoras de dicha interleuquina como de otras células T CD4<sup>+</sup> que las rodean, y que han sido también activadas por el reconocimiento del antígeno. Además la IL-2 es utilizada por las células T CD8<sup>+</sup>. Estos efectos permiten a las células T estimuladas por el antígeno, expandirse en número rápidamente. Los efectos biológicos de la IL-2, aunque originalmente se definen sobre la base del crecimiento de las células T en cultivo, se expanden a interacciones con macrófagos, células B activadas (Mond et al., 1985; Kishi et al., 1985), células NK (Henny et al., 1981; Ortaldo et al., 1984), y otras células citotóxicas (Gillis et al., 1979a; Zarlino & Bach, 1979), y ha sido usada como inmunoterapéutico contra el cancer y enfermedades infecciosas (Grimm et al., 1982; Mazumder & Rosenberg, 1984). El IL-2R está constituido por, al menos, tres componentes de membrana diferentes: la cadena  $\alpha$ , la  $\beta$  y la  $\gamma$ . La expresión de los genes que codifican para el IL-2R $\alpha$  y para su ligando, la IL-2, es indetectable en células T en reposo, pero se encuentran eficientemente



inducidos luego de la activación celular (Taniguchi & Yasuhiro, 1993). El gen del IL-2R $\beta$  se encuentra expresado constitutivamente en las células citotóxicas CD8 $^+$ , pero no en las helper CD4 $^+$ . Es también inducido durante la activación de las células T. La cadena  $\gamma$  es expresada constitutivamente en células linfocíticas (Takeshita et al., 1992). La expresión de diferentes combinaciones de estos tres componentes lleva a la generación de varias formas del IL-2R. La combinación de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  es requerida para la transducción de las señales, pero la reconstitución de la forma de alta afinidad del receptor ( $K_D = 10^{-11}$  M) requiere la participación adicional de la cadena  $\alpha$  (Taniguchi & Yasuhiro, 1993).

### 1.1.3. Subgrupos de células T CD4 $^+$

Las células CD4 $^+$  activadas pueden secretar una variedad de citoquinas, luego de ser estimuladas por el antígeno o por el mitógeno. Las células CD4 $^+$  pueden ser divididas en subgrupos, de acuerdo a los diferentes patrones de secreción de citoquinas. Estos patrones han sido definidos mediante el uso de clones celulares Th de ratón (Mosmann & Coffman, 1989). Inicialmente, dos patrones principales fueron identificados como se encuentra detallado en la tabla 2. La IL-2, el IFN- $\gamma$  y la linfotóxina se encuentran especialmente producidos por las células Th1 y no por las Th2. Por el contrario, las células Th2, pero no las Th1, secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Un gran número de citoquinas son secretadas por ambos tipos de clones, entre ellas, la IL-3, el GM-CSF y el TNF- $\alpha$  (Mosmann et al., 1986; Zurawski et al., 1986). La mayoría de las citoquinas que son producidas por ambos tipos de clones Th se encuentran secretados en mayores cantidades por las células Th1. Una excepción es Met-enkefalina, el cual es sintetizado preferencialmente por las Th2 (Zurawski et al., 1986).

Aunque los perfiles de secreción de citoquinas de las células Th1 y Th2 fueron originalmente descritos como patrones distintivos, ciertos estudios han establecido que un gran número de otros perfiles de secreción pueden ocurrir. Por ej., las células denominadas Th0 expresan todas las citoquinas hasta ahora conocidas y expresadas por los Th1 y Th2 (Firestein et al., 1989; Street et al., 1990). La síntesis combinada de IL-2, IL-4 y IL-5 en la ausencia de la producción de IFN- $\gamma$  se encuentra también descrita. Hasta el presente no está claro hasta qué punto estos patrones existen realmente *in vivo* como subpoblaciones funcionales.

**Tabla 2.** Producción de citoquinas por clones de células T CD4<sup>+</sup> (modificado de Mosmann & Coffman, 1989).

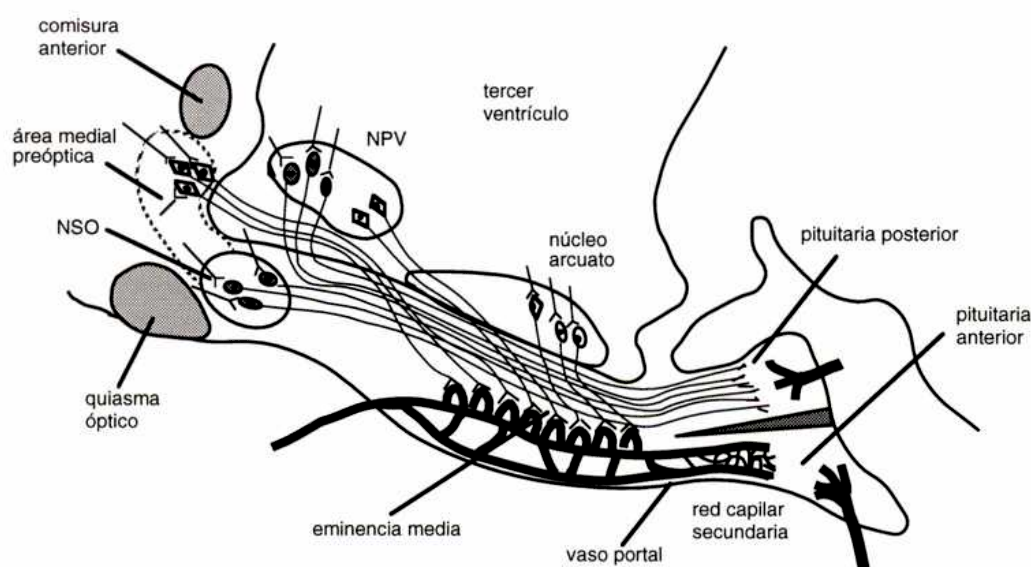
	Th1	Th2
IL-2	++	-
IFN- $\gamma$	++	-
Linfotoxina (TNF- $\beta$ )	++	-
GM-CSF	++	+
IL-3	++	++
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-6	-	++
IL-10	-	++

## 1.2. El eje hipotalámico-pituitario-adrenal

La secreción de glucocorticoides por la corteza adrenal (principalmente cortisol en humanos y corticosterona en ratas) es estimulada por la liberación de la hormona ACTH de los corticotrofos presentes en la pituitaria anterior. Dichos corticotrofos se encuentran a su vez bajo el control de factores de liberación, secretados por las neuronas dentro de la circulación portal hipotalámica-hipofisiaria (figura 2). Las principales sustancias inductoras de la secreción de ACTH conocidas hasta el presente son: la CRH, la AVP, la oxitocina y la epinefrina (Plotsky, 1985). Excepto la epinefrina, la cual es liberada por el núcleo catecolaminérgico del tronco cerebral, el resto de los factores de liberación nombrados, son sintetizados y secretados por las neuronas de los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo. Las neuronas hipofiseotróficas productoras de CRH se encuentran principalmente localizadas en la división medial parvocelular del núcleo paraventricular. Parte de dichas neuronas también expresan bajos niveles de AVP (Swanson et al., 1983;

Whitnall, 1988). Aunque las neuronas secretoras de oxitocina y la mayoría de las neuronas hipotalámicas productoras de AVP 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 causada por estresores específicos (Dohanics et al., 1991).

La actividad del eje HPA aumenta en respuesta al estrés y bajo condiciones no estresantes siguiendo un ritmo circadiano. El estrés constituye una perturbación de la homeostasis y puede ser tanto de naturaleza fisiológica como psicológica. El ritmo circadiano sigue a grandes trazos el ciclo de actividad. Los niveles de corticosteroides plasmáticos adquieren los niveles más altos antes del período de actividad y los más bajos antes del de reposo. Esto corresponde en humanos, a la mañana temprano o al atardecer, respectivamente. Los niveles de corticosterona en las ratas muestran valores exactamente opuestos a los descritos en humanos, lo que corresponde con la actividad nocturna de dichos animales (Krieger, 1977). La hormona CRH no sólo ocupa un lugar preferencial



**Figura 2.** Sistemas hipotálamo-neurohipófisis y hipotálamo-eminencia media en el hipotálamo de la ratas (NSO: núcleo supraóptico; NPV: núcleo paraventricular).

en la respuesta al estrés, sino que también se encuentra involucrada en diversos trastornos mentales. Un aumento en la secreción de CRH ha sido implicado en la depresión mayor, ansiedad y anorexia (Holsboer et al., 1992).

Tanto las actividades circadianas del eje HPA inducidas por el estrés, como las presentes en condiciones normales, son inhibidas por los glucocorticoides por un proceso de retroalimentación negativa (Dallman et al., 1987). La sensibilidad de la retroalimentación de todo el eje cambia de una manera circadiana: altos niveles plasmáticos de esteroides son requeridos para inhibir el pico de ACTH presente en el ritmo (Dallman et al., 1987). Los glucocorticoides pueden inhibir la secreción de ACTH tanto directa como indirectamente, con un efecto rápido en minutos como con uno retardado en más de dos horas (Keller-Wood & Dallman, 1984). Los corticosteroides actúan también directamente a nivel de la hipófisis y del hipotálamo (Dallman et al., 1987). Los sitios de retroalimentación a nivel cerebral además del hipotálamo son, entre otros el septum lateral, la formación hipocampal, la amígdala, el locus ceruleus, el núcleo motor del nervio craneano V, el núcleo del nervio craneano VII, el núcleo del tracto solitario, el núcleo del nervio craneano XII y el grupo de células noradrenérgicas A1. Dichos sitios fueron identificados, en parte, mediante técnicas de electrofisiología o por su estudio mediante lesiones, pero principalmente fueron inferidos de acuerdo a la presencia de receptores de corticosteroides.

Dos sistemas de receptores han sido identificados en el cerebro de la rata basados en su diferente afinidad por la corticosterona o por corticosteroides sintéticos desarrollados por Roussel-UCLAF (Reul & De Kloet, 1985). El receptor para corticosterona del tipo I, receptor clásico de mineralocorticoides (RM), presenta un  $K_d$  para corticosterona de 0,5 a 1 nM y una afinidad de unión a esteroides: corticosterona  $\geq$  aldosterona  $\gg$  dexametasona. Los receptores del tipo II, receptores clásicos para glucocorticoides (RG), tienen una menor afinidad por corticosterona (5 a 10 nM) y presentan el siguiente orden de afinidad dexametasona  $>$  corticosterona  $>$  aldosterona (Reul & De Kloet, 1985). Ambos receptores han sido clonados y los productos proteicos muestran la especificidad apropiada para el esteroide (Hollenberg et al., 1985; Arriza et al., 1987).

Contrastando con la amplia distribución a nivel central del RG, el RM está expresado en relativamente pocas áreas cerebrales. El RG se encuentra presente en el núcleo paraventricular y en otros núcleos hipotalámicos; en el sistema límbico constituido por el hipocampo, la amígdala y el septum; en la

corteza cerebral y en la mayoría de los núcleos monoaminérgicos del tronco cerebral (Stumpf & Sar, 1979; Reul & De Kloet, 1985; Dallman et al., 1987; Arriza et al., 1988). Dichos núcleos, incluyen entre otros el locus ceruleus, el núcleo del tracto solitario y el grupo de células catecolaminérgicas A1. El RM se encuentra casi exclusivamente en el sistema límbico y probablemente en ciertos núcleos motores del tronco cerebral. Sorprendentemente, el RM está ausente o presente en muy bajas concentraciones en el núcleo paraventricular (Stumpf & Sar, 1979; Reul & De Kloet, 1985; Dallman et al., 1987; Arriza et al., 1988; Swanson & Simmons, 1989).

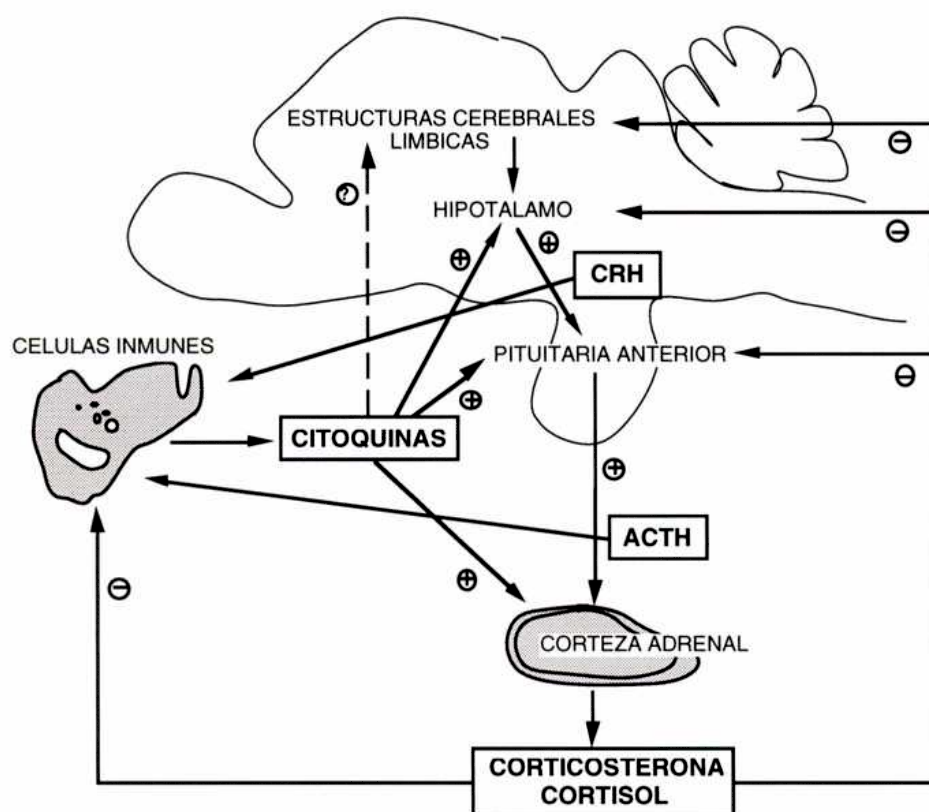
El hipocampo, conteniendo ambos tipos de receptores para corticosteroides, afecta los tres aspectos de la actividad del eje HPA: la respuesta al estrés, el ritmo circadiano y la retroalimentación negativa ejercida por los glucocorticoides. Trabajos disponibles hasta el momento sugieren que el hipocampo ejerce dichos efectos principalmente mediando el grado de intensidad de la inhibición causada por los corticosteroides.

Mediante el uso de técnicas de autoradiografía cuantitativa y de unión a membranas celulares, se identificaron los sitios de unión de alta afinidad de la CRH, los cuales presentan un patrón de distribución similar al de la síntesis de CRH (Wynn et al., 1984; De Souza et al., 1985). Fue observada una alta densidad de sitios de unión en la corteza y en el sistema límbico. Fuera del SNC, sitios de unión específicos para CRH fueron localizados en la pituitaria anterior, en todos los ganglios simpáticos, en el tejido cromafín de la médula adrenal y en otros órganos del cuerpo como por ej. el páncreas, el bazo y el intestino (Udelsman et al., 1986). 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 un  $K_d$  del orden nanomolar (Chen et al., 1986).

### **1.3. Efectos del sistema inmune sobre el sistema neuroendócrino**

La comunicación desde el sistema inmune hacia el sistema neuroendócrino se realiza a través de las citoquinas secretadas por el sistema inmune (figura 3). Estos factores actúan activamente a nivel del hipotálamo, de la pituitaria y de la glándula adrenal. La evidencia inicial de dicha comunicación fue reportada por Besedovsky et al. (1975), donde describe una correlación directa entre los niveles de glucocorticoides presentes en el suero, y la intensidad de una respuesta inmune. Numerosos trabajos describen posteriormente no sólo una

comunicación entre el sistema inmune y el sistema endócrino, sino también entre el sistema inmune y el sistema nervioso.



**Figura 3.** Comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el sistema neuroendócrino.

### 1.3.1. Las citoquinas y el eje HPA

#### 1.3.1.1. Interleuquina 1

La IL-1 afecta la función de las células del eje HPA *in vitro*. Fue descrita la inducción de la expresión del ARNm de POMC, precursor de ACTH, y la producción de ACTH en células de la pituitaria de rata por esta citoquina (Brown et al., 1987; Bernton et al., 1987). Otro estudio reporta que la IL-1 modifica la liberación de ACTH en células de la pituitaria de rata, mediante receptores  $\beta$ -

adrenérgicos (Boyle et al., 1988). En una línea celular corticotrófica murina, la IL-1 aumenta la producción de ACTH (Woloski et al., 1985). La IL-1 estimula la liberación de corticosterona y de prostaglandinas en cultivos primarios de células adrenales de rata (O'Connell et al., 1994) y en glándulas adrenales segmentadas en cuatro piezas (Gwosdow et al., 1992), a través de un mecanismo dependiente de catecolaminas (Andreis et al., 1991).

Numerosos trabajos implican a la IL-1 como la principal citoquina involucrada en la estimulación de la liberación de glucocorticoides *in vivo*. La administración *in vivo* de IL-1, aumenta la secreción de glucocorticoides (Besedovsky et al., 1986). La IL-1 $\beta$  aumenta la secreción de corticosterona actuando directamente sobre la glándula adrenal de la rata (Andreis et al., 1991). Se demostró la estimulación directa por la IL-1 de la producción de CRH en neuronas hipotalámicas *in vivo* (Berkenbosch et al., 1987; Sapolsky et al., 1987). Dichos grupos, sin embargo, no encuentran evidencias de una estimulación de la producción de ACTH inducida por la IL-1 en la pituitaria. La producción de ACTH inducida por el estrés es más sensible al efecto inhibitorio causado por una inyección de dexametasona que la ACTH inducida por una inyección icv de IL-1 (Weinfeld et al., 1989). Esto indicaría que la IL-1 modularía al eje HPA, al menos parcialmente, interfiriendo en la regulación negativa ejercida por los glucocorticoides circulantes (Weinfeld et al., 1989). En ratas con una desaferentación completa del hipotálamo medio basal, cuando la IL-1 fue inyectada ip, inhibe la respuesta hormonal de ACTH y de corticosterona, mientras que una inyección icv de IL-1 causa un marcado incremento de las mismas. Dichos datos sugieren la activación del eje HPA por la citoquina debido a un efecto directo central (Ovadia et al., 1989). La acción directa de la IL-1 sobre la pituitaria para la liberación de ACTH es aún controvertida. Numerosos trabajos indican que el sitio primario de acción de la IL-1 es el cerebro, y que dicha citoquina, actúa tanto directa como indirectamente a nivel del hipotálamo estimulando la liberación de CRH (Sapolsky et al., 1987; Berkenbosch et al., 1987; Katsuura et al., 1988). La infusión icv de bajas dosis de IL-1 en el cerebro de rata produce una supresión rápida de diferentes respuestas celulares inmunes medidas en los linfocitos periféricos (Sundar et al., 1989). Dicha supresión es revertida completamente cuando el anticuerpo anti-CRH es infundido dentro del ventrículo lateral y sólo parcialmente cuando se bloqueó la transmisión neuronal simpática (Sundar et al., 1990). La inyección icv de IL-1 resulta en la supresión de la secreción de IL-1 estimulada, *in vitro*, por LPS en macrófagos del bazo (Brown et al., 1991).

La IL-1 afecta, además de la producción de hormonas pertenecientes al eje HPA, la liberación de otras hormonas como la hormona del crecimiento, las hormonas gonadotróficas, la hormona tirotrófica y la prolactina (Besedovsky & del Rey, 1992).

#### 1.3.1.2. *Interleuquina 6 y TNF- $\alpha$*

La acción biológica de la IL-1 sobre el eje HPA es compartida con otras dos citoquinas, las cuales participan también en procesos inflamatorios: la IL-6 y el TNF- $\alpha$  (Bateman et al., 1989; Hermus & Sweep, 1990). En cuanto al TNF- $\alpha$ , una inyección iv del mismo, en ratas, produce una elevación en los niveles de ACTH plasmáticos (Sharp et al., 1989; Bernardini et al., 1990). Luego de la administración de TNF en el tercer ventrículo se obtiene una estimulación en la liberación de ACTH, prolactina y de la hormona del crecimiento y una inhibición en la producción de la hormona tirotrófica (McCann et al., 1990). Estudios *in vitro* muestran que esta citoquina estimula la secreción de CRH en cultivos hipotalámicos (Bernardini et al., 1990) y de ACTH, actuando directamente sobre las células de la pituitaria (Milenkovic et al., 1989). A su vez también inhibe la secreción de ACTH estimulada por CRH *in vitro* (Gaillard et al., 1990). Contrariamente, un trabajo reportado por Navarra *et al*, no encuentra un efecto del TNF- $\alpha$  sobre las células de la pituitaria o del hipotálamo, atribuyendo dicho resultado a las condiciones experimentales elegidas, las cuales difieren de trabajo en trabajo (por ej. las concentraciones utilizadas, el uso de proteínas humanas recombinantes en cultivo de células de ratas y los diferentes períodos de incubación) (Navarra et al., 1991). Recientemente se demostró que la aplicación ip del anticuerpo anti-IL-6, 6 a 20 horas antes de la administración de IL-1, bloquea la inducción del aumento en los niveles plasmáticos de ACTH estimulados por IL-1 (Neta et al., 1992).

#### 1.3.1.3. *IFN e interleuquina 2*

Además de las citoquinas nombradas, otras también participan en la regulación del sistema neuroendócrino: el IFN- $\alpha$  y  $\gamma$  y la IL-2. El IFN- $\alpha$  estimula la liberación de cortisol tanto *in vivo* (D'Urso et al., 1991) como *in vitro*, actuando directamente sobre la glándula adrenal (Cardoso et al., 1990). Se observó que el IFN- $\gamma$  aumenta la secreción de cortisol independientemente de la de ACTH, probablemente actuando en células linfoides, las cuales liberarían una sustancia



hasta hoy desconocida, que activaría directamente la corteza adrenal (Holsboer et al., 1988). Estudios *in vivo* muestran que la administración de IL-2 en pacientes con cáncer, aumenta los niveles de  $\beta$ -endorfina, ACTH y cortisol (Lotze et al., 1985; Denicoff et al., 1989). Por otro lado esta citoquina induce aumentos en los niveles de  $\beta$ -endorfina cuando es administrada en ratas atómicas (Zakarian et al., 1989), y de ACTH en animales normales (Naito et al., 1989).

Diversos estudios muestran la estimulación de la expresión del gen de POMC por la IL-2 *in vitro* y la inducción de la liberación de ACTH por dicha citoquina en la línea celular murina AtT-20 y en cultivos de células de la pituitaria anterior de la rata (Brown et al., 1987; Smith et al., 1989; Karanth & McCann, 1991). En este último caso, también se observó la liberación de otras hormonas como la prolactina (Karanth & McCann, 1991). La IL-2 de rata aumenta los niveles de corticosterona de un modo dependiente de la concentración cuando es administrada durante 24 horas en cultivos de glándulas adrenales de ratas (Tominaga et al., 1991). Diversos grupos no encuentran evidencias de efectos de la IL-2 en la producción de ACTH y corticosterona. Recientemente, sin embargo, se demostró que la IL-2 de rata estimula la secreción de ACTH en estos animales, no produciéndose dicha estimulación cuando la IL-2 humana es utilizada. Así, la diferencia de especies en el sistema experimental debe ser considerada al estudiar el rol fisiológico de las citoquinas en el sistema neuroendócrino (Naito et al., 1989).

### **1.3.2. Las citoquinas y el SNC**

El sistema inmune, a través de las interleuquinas, muestra diversas acciones dentro del sistema neuroendócrino, particularmente a nivel cerebral. Tres días después de la administración de un antígeno, fue detectado en el núcleo ventromedial pero no en el núcleo anterior del hipotálamo de la rata, un aumento en la tasa de descarga neuronal (Besedovsky et al., 1977). Bajo dicha condición, fueron también encontrados cambios en la actividad del núcleo paraventricular y en el área preóptica anterior del hipotálamo (Saphier et al., 1987). Una disminución en la concentración de noradrenalina en las neuronas noradrenérgicas del hipotálamo y del tronco cerebral fue inducida por una inyección ip de sobrenadantes obtenidos de esplenocitos estimulados por Con A (Besedovsky et al., 1983).

Tanto la IL-1 como el TNF- $\alpha$  son importantes reguladores del sueño (Krueger, 1990). Cantidades picomolares de IL-2 inyectadas en el tercer ventrículo de la rata producen de una manera dosis-dependiente, efectos soporíferos y alteran la actividad bioeléctrica en el electroencefalograma, aún cuando el sitio principal a través del cual se median los efectos que provocan el sueño es el locus ceruleus (Nisticó & De Sarro, 1991). Bindoni et al. (1988) demostraron que la administración de IL-2 en el tercer ventrículo de la rata es seguida de un marcado y significativo decaimiento en la frecuencia de descarga neuronal en el núcleo ventromedial del hipotálamo y de un aumento de la misma en los núcleos supraóptico y paraventricular. La IL-1, junto con otras citoquinas, actúan a nivel cerebral induciendo cambios significativos en el comportamiento, por ej. anorexia, adipsia y decrecimiento en la actividad locomotora, como también en la regulación de la temperatura corporal (Bindoni et al., 1988; Dunn & Berridge, 1990).

Estas observaciones marcan la importancia de las citoquinas en el ajuste de procesos comportamentales, determinando las posibilidades de un animal de sobrellevar enfermedades o infecciones.

De acuerdo a los efectos de las interleuquinas sobre los procesos de crecimiento y de diferenciación celular, ha sido demostrado que la IL-1 estimula la proliferación de astrocitos pero no de oligodendrocitos, mientras que la IL-2 estimula sólo a los oligodendrocitos (Merrill, 1990). La regulación de la respuesta de los oligodendrocitos a IL-2 demuestra la implicancia de dicha citoquina a niveles de desarrollo: concentraciones muy bajas de la misma inhiben la proliferación de las células progenitoras, menos maduras, de los oligodendrocitos (Saneto et al., 1986).

Estos trabajos, elegidos a modo de ejemplo sobre la acción de las citoquinas en el sistema nervioso, muestran que, aunque los mecanismos están pobremente entendidos, las acciones implican esencialmente dos tipos de efectos: una acción sobre el comportamiento y otra sobre el crecimiento y la diferenciación celular dentro del SNC.

### **1.3.3. El sistema inmune y la actividad simpática**

La observación de que los niveles de noradrenalina en el bazo son inversamente proporcionales a la actividad inmunológica, sugiere una regulación del sistema inmune sobre la actividad simpática. Esta relación fue observada en

animales inyectados con un antígeno (del Rey et al., 1981; Carlson et al., 1987); como también en animales libres de gérmenes y expuestos a antígenos ambientales, cuando son comparados con animales mantenidos en un ambiente libre de patógenos. Recientemente fue demostrado que una inyección iv de IL-1 aumenta la tasa de descarga de la inervación simpática adrenal y esplénica (Nijima et al., 1991). Luego de una inyección ip de IL-1 se produce un aumento de la tasa de recambio de la noradrenalina en el bazo y en el pulmón pero no en el corazón ni en otros tejidos de la rata (Akiyoshi et al., 1990), sugiriendo que la disminución en la concentración de noradrenalina en el bazo, encontrada en trabajos previos, resulta en un aumento de recambio de la misma.

La modulación de la actividad simpática por el sistema inmune se lleva a cabo de dos maneras diferentes: a través del control de los centros autonómicos del hipotálamo o a niveles locales, a través de interacciones recíprocas entre células del sistema inmune y terminales nerviosas dentro de los órganos linfoides. Evidencias para el primer modo de interacción son encontradas en los cambios de la tasa de descarga y en los niveles de noradrenalina en regiones discretas del hipotálamo luego de un desafío antigénico (Besedovsky et al., 1977). Los sitios autonómicos centrales pueden influir la actividad simpática y, como consecuencia, el flujo de noradrenalina en los órganos linfoides. Evidencias indirectas existen para el segundo modo de regulación: la asociación cercana entre las terminales nerviosas y los linfocitos, demostradas por microscopía electrónica en el bazo de la rata y la regulación de la actividad de las células nerviosas simpáticas por citoquinas derivadas de los macrófagos. Esplenocitos estimulados o no con Con A agregados a cultivos de neuronas del ganglio cervical superior regulan la expresión del ARNm de la hidroxilasa de tirosina y del neuropéptido Y (Barbany et al., 1991). En otro estudio, el TNF reduce la liberación de noradrenalina tritiada por las neuronas del ganglio superior cervical despolarizadas por exceso de potasio, 6 minutos después de la despolarización (Soliven & Albert, 1992). En este sistema experimental, ni el TNF ni la IL-1 alteran la liberación espontánea basal de noradrenalina tritiada.

Estos resultados sugieren que los productos de secreción del sistema inmune pueden modular las actividades fisiológicas del sistema nervioso simpático *in vivo*. La regulación local de la actividad simpática podría permitir una rápida respuesta a activaciones o perturbaciones del sistema inmune, mientras que, la comunicación a través del SNC, permitiría una coordinación sistémica de los

---

sistemas neuroendócrino, autonómico e inmune, como también ajustes prolongados en los mismos (Madden & Felten, 1995).

#### **1.4. Expresión de citoquinas y sus receptores en el sistema neuroendócrino**

Numerosos trabajos plantean al sistema nervioso central no sólo como blanco de la acción de las linfoquinas sino también como sitio de origen de las mismas. Células de la micro y macroglía se hallan descritas como productoras de IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 (Giulian et al., 1986; Merrill, 1987; Luber-Narod & Rogers, 1988; Liebermann et al., 1989; Okamoto et al., 1990; Merrill, 1990; Velasco et al., 1991). La expresión de IL-1R y IL-2R fue detectada tanto a nivel proteico como del ARNm en neuronas principalmente localizadas en el hipocampo (Farrar et al., 1987; Araujo et al., 1989; Cunningham et al., 1991; Ban et al., 1991; Cunningham & De Souza, 1993). La expresión del ARNm del antagonista del IL-1R fue localizada, por hibridización *in situ*, en el núcleo paraventricular del hipotálamo, en el hipocampo y en el cerebelo (Licino et al., 1991). Fibras presentando inmunoreactividad para IL-1 $\beta$  fueron encontradas en el hipotálamo, innervando grupos celulares claves del sistema endócrino (Breder et al., 1988). Dicha observación sugiere la posible contribución central de dicha citoquina en la modulación del eje HPA. La presencia de IL-6 y del IL-6R fueron observados en el cerebro de la rata, por ej. en el hipocampo y hipotálamo, por hibridización *in situ* (Schöbitz et al., 1992). Cultivos del hipotálamo basal medial de la rata mostraron producir IL-6 y expresar su ARNm (Spangelo et al., 1990).

Recientemente, fue reportada la producción de IL-1 y de IL-6 por células de la pituitaria. Material inmunoreactivo para IL-1 $\beta$  y para su mensajero fueron encontrados en la glándula hipofisaria de ratas. Ambos aumentaron luego del tratamiento de los animales con LPS (Koenig et al., 1990). IL-1R y su mensajero fueron caracterizados en células hipofisarias de ratón y en células corticotróficas de la línea celular AtT20 (De Souza et al., 1989; Bristulf et al., 1991). Se observó la expresión del ARNm de IL-6 y la producción de esta linfoquina por células obtenidas de la pituitaria anterior de ratas (Vankelecom et al., 1989; Spangelo et al., 1990), así como también la presencia del IL-6R en la misma (Ohmichi et al., 1992). Dicha producción es estimulada por IL-1 (Spangelo et al., 1991). La expresión del ARNm de IL-6 fue también descrita en cultivos de células de adenomas hipofisarios humanos (Velkeniers et al., 1994). Fue reportada la liberación de IL-6 por cultivo de células de adenomas hipofisarios humanos

---

(Jones et al., 1991). IL-2 y su receptor fueron también encontrados en la pituitaria, y en las líneas celulares de pituitaria de rata, GH3 y corticotrófica de ratón, AtT-20 (Arzt et al., 1992).

El modo que permite a las citoquinas el despliegue de acciones centrales, como la modulación de la actividad neuronal o el desarrollo de funciones tróficas durante daños cerebrales, enfermedades neurodegenerativas, desarrollo, muerte celular programada, no se encuentra aclarado con precisión (De Kloet et al., 1994). Las interleuquinas pueden ser producidas periféricamente y actuar centralmente en forma directa, a través de áreas cerebrales donde la barrera hematoencefálica está ausente, por ej. el núcleo arcuatus, el área preóptica, la glándula pineal, el área postrema y el tuber cinereum (Seris, 1988; Banks et al., 1989). De otro modo, las interleuquinas pueden cruzar la barrera mediante un sistema de transporte saturable (Banks & Kastin, 1992; Gutierrez et al., 1993; Banks et al., 1994) o no saturable, como en el caso de la IL-2 (Waguespack et al., 1994). A su vez, la mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica, como consecuencia de ciertas condiciones patológicas, permite a las interleuquinas introducidas periféricamente alcanzar distintas áreas del SNC más fácilmente (Sharief et al., 1993).

La producción local de citoquinas por el sistema inmune induce también señales en el SNC vía neuronas sensoriales o actuando directamente sobre terminales nerviosas eferentes periféricas, como por ej. las terminales simpáticas noradrenérgicas, para inducir cambios en la liberación de neuropeptidos o de neurotransmisores. Por otro lado, numerosos trabajos sugieren como prerequisite para la formación de lesiones inflamatorias en enfermedades (auto)inmunes del SNC, la interacción de los linfocitos con las células endoteliales cerebrales. Evidencias indican la presencia de antígenos que reconocen a los linfocitos T, los cuales se encuentran presentes en la barrera hematoencefálica y permitirían a dichas células el cruce de la misma. Además y como ha sido descrito anteriormente, las interleuquinas pueden actuar en forma autócrina y/o parácrina dentro del SNC debido a que, tanto ellas como sus receptores, son producidos a dicho nivel (Madden & Felten, 1995).

## 1.5. Efectos del eje HPA sobre la respuesta inmune

### 1.5.1. Los glucocorticoides y el sistema inmune

Los glucocorticoides ejercen un amplio rango de acciones complejas en cada fase de la respuesta inmune e inflamatoria, tanto en animales como en humanos. Se hallan descritos entre las drogas más potentes y más usadas con efectos antiinflamatorios e inmunosupresivos. Los mecanismos por los cuales los glucocorticoides inducen inmunosupresión y contrarrestan los procesos de inflamación incluyen: la lisis de linfocitos, la inhibición de la función linfocitaria, la redistribución linfocitaria o la inhibición de la producción y/o la actividad de sustancias vasoactivas por bloqueo de pasos en el metabolismo del ácido araquidónico (Cupps & Fauci, 1982). Los efectos de los glucocorticoides sobre el sistema inmune varían de acuerdo a las especies (Claman, 1975) y al tipo de células linfoidea, su función, ubicación, estado de maduración, o activación biológica (Munck & Guyre, 1991). Las propiedades antiinflamatorias e inmunosupresivas confieren a los glucocorticoides un rol fisiológico fundamental en la respuesta al estrés: previenen una respuesta exagerada durante la activación de los mecanismos de defensa, la cual podría ser perjudicial para el organismo (Munck et al., 1984).

#### 1.5.1.1. *Receptores de glucocorticoides en el sistema inmune*

Los RG se encuentran presentes en la mayoría de los tipos celulares del sistema inmune (Homo-Delarche & Duval, 1987), y parecerían mediar los potentes efectos inmunosupresivos de los glucocorticoides (Munck et al., 1990). La distribución de los RM en tejidos inmunes está más acotada y poco se sabe sobre su rol funcional (Armanini et al., 1985; Miller et al., 1991). El número de sitios de unión para los glucocorticoides presentes en CMPS humanas se encuentra entre los 3000 y 8000 sitios/célula con un  $K_d$  de alrededor de  $10^{-8}$  M (Homo-Delarche & Duval, 1987). No han sido encontradas diferencias significativas en el número de sitios de unión de los glucocorticoides en células T o en células B (3000 - 4000 sitios/célula) (Lippman & Barr, 1977; Homo et al., 1979; Wang et al., 1984). Sin embargo, los monocitos, contienen 2 - 5 veces más sitios de unión que los linfocitos (Lippman & Barr, 1977; Werb et al., 1978). El número de sitios de unión en timocitos humanos y en células de los nódulos linfáticos es comparable al número presente en los CMPS humanas (Homo-Delarche et al., 1979). En otras especies, como el ratón y la rata, la capacidad

de unión de glucocorticoides en células del timo o del bazo es similar a la de las células humanas (Naray et al., 1980).

La sensibilidad a los glucocorticoides no está correlacionada significativamente con el número de RG presentes ni con la afinidad de los mismos en distintos tejidos linfocitarios, por ej. en el bazo y en el timo, ni en distintas especies (Naray et al., 1980). Variaciones en el número de RG durante el ciclo celular o seguidos por una estimulación mitogénica, no ocurren en paralelo con un cambio en la sensibilidad (Neifeld et al., 1977; Smith et al., 1977; Crabtree et al., 1980). Células mutantes, con falta de receptores funcionales sí se muestran insensibles a los glucocorticoides (Gehring, 1980; Gruol et al., 1986). Así, mecanismos específicos celulares, además de la presencia de RG, deben ser importantes en la determinación de la sensibilidad de un cierto grupo de células a los glucocorticoides (Munck & Guyre, 1991). El número de receptores y su afinidad son sólo dos facetas de la cascada de eventos que ocurren antes de una cierta respuesta fisiológica a los glucocorticoides. La sensibilidad a los glucocorticoides de un cierto grupo de células puede estar también modulada a otros niveles como en la unión de RG al ADN, la transcripción o por la presencia de ciertas citoquinas y de sus receptores. Así, cambios en el número de sitios de unión o en la afinidad, solo tienen relevancia patofisiológica si son acompañados por cambios en la sensibilidad a los glucocorticoides (Rousseau, 1984).

#### *1.5.1.2. Los glucocorticoides y las células inmunes*

Ha sido encontrada una relación inversa entre los niveles endógenos plasmáticos de glucocorticoides y el peso del bazo, el número de células nucleadas, y los niveles basales de células secretoras de inmunoglobulinas (del Rey et al., 1984). La administración de glucocorticoides exógenos, especialmente en dosis mayores que las fisiológicas, inducen la involución del timo, y disminuyen el número de timocitos, esplenocitos y de linfocitos sanguíneos periféricos (Dracott & Smith, 1979). Las células T inmaduras presentes en la corteza del timo y las células B foliculares, son susceptibles a la lisis por glucocorticoides, mientras que las células T maduras medulares y las células B activadas, son relativamente resistentes a la muerte celular (Cohen & Duke, 1984).

Los glucocorticoides afectan la redistribución de diversas poblaciones leucocitarias y de este modo disminuyen su acceso a sitios de inflamación causando linfopenia, monocitopenia y eosinopenia, alterando así, la función de

---

las células inmunocompetentes. Cox y Ford (1982) demostraron que la infusión de prednisona causa una redistribución de las células circulantes desde la sangre a la médula ósea, disminuye el número de linfocitos en los nódulos linfáticos y altera la circulación de dichas células a través de las vénulas endoteliales, una ruta de salida hacia los sitios linfoides secundarios.

La mayoría de los estudios demuestran que los glucocorticoides causan la supresión de la respuesta inmune celular. Glucocorticoides sintéticos y naturales inhiben la proliferación de células T estimuladas *in vitro* por aloantígenos o por mitógenos, a través de receptores citoplasmáticos de glucocorticoides (Smith et al., 1977; Werb et al., 1978; Munck & Guyre, 1991). Dicha inhibición, en la presencia de mitógenos (Con A o PHA) *in vitro*, fue detallada en el hombre, en el ratón y en la rata (Neifeld et al., 1977; Smith et al., 1977; Gillis et al., 1979b; Larsson, 1980; Crabtree et al., 1980; Munck & Guyre, 1991; Paliogianni et al., 1993; Wieggers et al., 1993; Wieggers et al., 1994). Estos resultados fueron confirmados *in vivo* (Fauci & Dale, 1974; Cupps & Fauci, 1982).

La generación y función efectora de los linfocitos T citotóxicos, importante herramienta inmunológica contra virus y tumores, también se encuentra diferencialmente afectada por los glucocorticoides. Los mismos inhiben la generación y la actividad de las células T citotóxicas (Cohen et al., 1970; Mauer et al., 1970; Gillis et al., 1979c). Este último efecto sólo aparece después de la preincubación de las células con los glucocorticoides (Schleimer et al., 1984). En general, la actividad NK, también es suprimida por esta hormonas tanto *in vitro* (Cox et al., 1982; Holbrook et al., 1983), como *in vivo* (Hochman & Cudkowicz, 1979).

La presencia de los macrófagos puede modificar la respuesta de las células T a los glucocorticoides. La actividad de las células Th fue inhibida por los glucocorticoides, sin embargo, cuando dichas células se encontraron en la presencia de macrófagos activados o de sus productos, no se observó inhibición de la actividad (Bradley & Mishell, 1981). Bertoglio y Leroux (1988) observaron que el aumento o la supresión de la incorporación de timidina tritiada en clones de células T estimulados por un antígeno, dependen del estímulo proliferativo y de la presencia de otros factores de crecimientos, por ej. la IL-2 o la IL-4.

Los efectos de los glucocorticoides sobre las células B son variables, dependiendo del sistema testado y de las condiciones aplicadas. No han sido extensamente estudiados, por lo cual su interpretación, no es aún clara. Los



---

corticosteroides pueden potenciar, *in vitro*, la diferenciación de células B humanas bajo ciertas condiciones (Orson et al., 1983; Emilie et al., 1987). En roedores, tanto la proliferación espontánea de esplenocitos, como la inducida por LPS, están inhibidas por los glucocorticoides (Roess et al., 1982). Varios estudios demostraron tanto supresión como aumento en la producción de inmunoglobulinas (Cupps & Fauci, 1982; Emilie et al., 1987; Wu et al., 1991b).

### 1.5.1.3. Los glucocorticoides y las citoquinas

La mayoría de las acciones ejercidas por los glucocorticoides, las cuales afectan la funcionalidad de la inmunidad celular y/o humoral, se encuentran indirectamente mediados por la inhibición de la producción de citoquinas (Munck & Guyre, 1991). Un gran número de citoquinas se hallan reguladas por la acción de los glucocorticoides. Numerosos trabajos muestran que la exposición a glucocorticoides inhibe la transcripción del gen de IL-1 $\beta$ , disminuye la estabilidad del ARNm (Knudsen et al., 1987; Lee et al., 1988; Lew et al., 1988) y su producción por macrófagos *in vitro* (Snyder & Unanue, 1982). Además, actúan inhibiendo la función y diferenciación de células macrofágicas (Baybutt & Holsboer, 1990). La dexametasona y el cortisol inhiben la síntesis del antagonista del IL-1R en monocitos humanos estimulados con endotoxina, tanto *in vivo* como *in vitro* (Arzt et al., 1994).

Diversos trabajos han reportado la inhibición por glucocorticoides de la producción de IL-2 tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Gillis et al., 1979b; Gillis et al., 1979c; Boumpas et al., 1991). Estudios subsecuentes muestran que dichos esteroides suprimen la acumulación del ARNm de la IL-2 (Arya et al., 1984; Almawi et al., 1991), disminuyen la estabilidad de su mensajero (Boumpas et al., 1991), e inhiben su transcripción (Northrop et al., 1992). Recientemente, fue identificada en la región promotora del gen de IL-2, una subregión que responde a los glucocorticoides, responsable del efecto inmunosupresor de la dexametasona (Vacca et al., 1992). En la presencia de glucocorticoides, las células T activadas tanto *in vitro* como *in vivo*, exhiben una reducción en la producción de IL-2 pero un aumento en la de IL-4 (Gillis et al., 1979b; Daynes & Araneo, 1989). Experimentos realizados por Bertoglio y Leroux (1988) sugieren que mientras la producción de IL-4 por células T murinas no se encuentra afectada por los glucocorticoides, su acción está potenciada. Finalmente, la síntesis y la acumulación de ARNm de IL-4 por

CMPS humanos estimulados con PHA más miristato acetato de phorbol son inhibidos por estos esteroides (Wu et al., 1991a).

Otras citoquinas se encuentran también bajo la regulación de las hormonas glucocorticoideas. La transcripción del gen de IL-6 se encuentra inhibida por los glucocorticoides tanto en CMPS como en fibroblastos humanos (Zanker et al., 1990; Tobler et al., 1992). La síntesis de IFN- $\beta$  por fibroblastos humanos está inhibida por los glucocorticoides. Sin embargo, fue observado que la expresión de el IFN- $\beta$  es suprimida debido a una reducción progresiva en la concentración de su ARNm y no por un cambio en la tasa de transcripción (Gessani et al., 1988). Del mismo modo TNF- $\alpha$  es inhibido por los glucocorticoides a niveles post-transcripcionales pero debido a un aumento en la tasa de degradación del ARNm (Beutler & Cerami, 1988). Una reducción en la acumulación del ARNm de IFN- $\gamma$  (Arya et al., 1984; Grabstein et al., 1986) es acompañada por una disminución en la producción de la proteína (Kelso & Munck, 1984). Otro ejemplo dentro de las acciones de los glucocorticoides lo constituye la inhibición de la transcripción del gen que codifica para la IL-3 (Culpepper & Lee, 1985).

#### *1.5.1.4. Los glucocorticoides y los receptores de citoquinas*

La influencia de los glucocorticoides en la expresión de receptores de interleuquinas presenta resultados contradictorios. La expresión del receptor de alta afinidad de IL-1 en células B humanas pero no en células T o en monocitos, está potencialmente estimulada por los glucocorticoides (Akahoshi et al., 1988). Trabajos que analizan paralelamente la expresión del gen del IL-2R $\alpha$  con la del gen de IL-2 encuentran que los niveles del ARNm del receptor están menos inhibidos que los de la citoquina y que los glucocorticoides inducen una supresión en la acumulación del IL-2R $\alpha$  (Grabstein et al., 1986; Boumpas et al., 1991). En CMPS humanas y en células T enriquecidas con CMPS, los niveles del ARNm del IL-2R $\alpha$  están sólo inhibidos post-transcripcionalmente por concentraciones altas de glucocorticoides (Boumpas et al., 1991). En el límite superior del rango fisiológico no fueron encontrados efectos sobre la expresión del gen de IL-2R $\alpha$ , ni en el número de moléculas del receptor presentes en la superficie celular (Bettens et al., 1984; Boumpas et al., 1991). En un clon de células murinas Th2, los glucocorticoides no inducen ningún efecto en la expresión del receptor de alta afinidad de IL-2 (Bertoglio & Leroux, 1988). En contraste, la inducción de la IL-2R $\alpha$  y de la expresión del receptor de alta afinidad para la IL-2 en hibridomas de células T de rata estimulados por IL-2

---

exógena pudieron ser potencialmente aumentadas debido a la adición de glucocorticoides (Fernandez-Ruiz et al., 1989). Los glucocorticoides además, inducen la expresión de IL-6R en una línea celular epitelial humana y la acumulación de su ARNm (Snyers et al., 1990; Rose-John et al., 1990).

### 1.5.2. La ACTH y el sistema inmune

La mayoría de las interacciones entre los sistemas neuroendócrino e inmune son atribuidas a los efectos de los glucocorticoides. Sin embargo, se puso en evidencia que los péptidos del eje HPA pueden modular directamente la respuesta inmune, a través de receptores específicos presentes en el tejido inmune. Las células del sistema inmune presentan receptores para ACTH (Weigent & Blalock, 1987). 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. Un receptor de alta afinidad ( $K_d$  0,1 nM) y otro de baja afinidad ( $K_d$  4,8 nM) (Johnson et al., 1982). Un aumento de los receptores de ACTH presentes en inmunocitos, fue observado luego de una estimulación mitogénica de las células (Smith et al., 1987; Clarke & Bost, 1989).

Entre las diferentes acciones regulatorias ejercidas por la ACTH sobre la función inmune se encuentran el aumento de la respuesta proliferativa de las células B cuando se encuentra presente junto con la IL-5 (Brooks, 1990) y la inhibición de la producción de anticuerpos dependiente o independiente de las células T, cuando la hormona actúa en concentraciones del orden micromolar (Johnson et al., 1982). Los efectos de la hormona son dependientes de la concentración utilizada: en concentraciones subnanomolares se induce la secreción de IgM por la línea murina de células B, mientras que, cantidades micromolares inhiben la misma (Bost et al., 1990). El tratamiento de ratones adrenalectomizados con ACTH no tiene efecto sobre la producción de anticuerpos por esplenocitos, *in vitro* (Gisler & Schenkel-Hulliger, 1971). La función de las células T y de los macrófagos también se encuentra modulada por la ACTH. Esta hormona suprime la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T (Johnson et al., 1984). Además de bloquear la producción del IFN, la ACTH bloquea la habilidad del mismo de activar a los macrófagos hacia un estado tumorocida (Koff & Dunegan, 1985).

### 1.5.3. La CRH y el sistema inmune

La CRH ejerce acciones regulatorias sobre el sistema inmune actuando tanto como hormona o como neuropéptido. La CRH juega un rol esencial en los efectos ejercidos por el fenómeno de estrés sobre el sistema inmune (Saperstein et al., 1992).

Receptores de CRH han sido encontrados en monocitos, en linfocitos T presentes en la sangre periférica humana (Singh & Fudenberg, 1988) y en macrófagos del bazo del ratón (Webster et al., 1990). Mientras que la posibilidad de una acción directa de CRH sobre la producción de linfoquinas *in vivo* no fue estudiada en detalle, su acción *in vitro* se encuentra descrita en diversos trabajos. La CRH estimula la proliferación de las CMPS humanas, la expresión del IL-2R en células T activadas (Singh, 1989) y la producción de IL-1 y de IL-2 (Singh & Leu, 1990). En humanos, la CRH no afecta la respuesta proliferativa de los linfocitos B (Singh et al., 1990). Dicha hormona tampoco afecta la actividad de los NK *in vitro* (Singh et al., 1990) o de afectarla ejerce una acción supresiva (Pawlikowski et al., 1988). A diferencia de los resultados observados en humanos, al estudiar los esplenocitos de rata, se observó que el aumento de la respuesta proliferativa está solamente mediada por las células B (McGillis et al., 1989). Recientemente se vio un efecto inhibitorio directo de CRH sobre la producción *in vitro* de IL-6 y de IL-1 mediada por LPS en monocitos (Hagan et al., 1992).

La administración de CRH icv en una única dosis, produjo una supresión dosis-dependiente de la actividad de las células NK del bazo de rata (Irwin et al., 1987). La administración central de anticuerpos anti-CRH antagonizó completamente la supresión inducida por el estrés de la actividad de las células NK (Irwin et al., 1990b). Más aún, anticuerpos anti-CRH tanto como un antagonista específico de CRH, administrado iv o icv, bloquean la inmunosupresión de la proliferación de los linfocitos T o de la citotoxicidad ejercida por los NK causada por shock (Jain et al., 1991). La inyección de CRH en el ventrículo lateral del cerebro de la rata produce una activación del eje HPA como también del sistema nervioso autonómico, como lo indican los niveles elevados plasmáticos de noradrenalina (Irwin et al., 1990b). En paralelo a estos cambios neuroendócrinos, se observó una reducción de la actividad de células NK presentes en el bazo (Irwin et al., 1988). El pretratamiento con el bloqueante periférico ganglionar simpático, chloridondamine, previene tanto el aumento en noradrenalina como la reducción de la actividad NK, mientras que los niveles de

ACTH y de corticosterona permanecen elevados. Similarmente, la inmunosupresión periférica inducida por la administración icv de la IL-1 resulta, en parte, de una activación del sistema nervioso autonómico simpático (Brown et al., 1987; Sundar et al., 1990).

Un reporte reciente muestra que la CRH es producida localmente en sitios de inflamación donde actúa como una citoquina autócrina o parácrina participando del fenómeno inflamatorio (Karalis et al., 1991).

#### **1.5.4. El eje HPA y la respuesta inmune: estudios in vivo**

Los glucocorticoides juegan un rol esencial en la regulación de los mecanismos de defensa del organismo. Cualquier condición patológica, que resulte en un cambio en la liberación de los glucocorticoides por las glándulas adrenales, podría llevar a la activación descontrolada de los mecanismos de defensa. Como consecuencia podrían desarrollarse enfermedades autoinmunes o estados de shock (Munck et al., 1984). Por el contrario, una hipersecreción de los glucocorticoides llevaría hacia una función inmune suprimida, hipertensión, y a una mayor susceptibilidad en el desarrollo de trastornos mentales (Munck et al., 1984; Holsboer, 1989).

Diferentes estudios *in vivo* destacan la importancia del uso de modelos animales con una regulación diferencial del eje HPA, para aumentar el conocimiento sobre las interacciones específicas entre los sistemas neuroendócrino e inmune y el rol de dichas interacciones en procesos patológicos. Diversos experimentos demostraron la importancia de un eje HPA intacto, particularmente puntualizando el rol de la pituitaria en el desarrollo de una respuesta inmune apropiada. Ha sido demostrado que la glándula hipofisiaria es requerida para la protección contra los efectos letales de *Salmonella typhimurium*: animales a los cuales se les extirpó la mitad de la hipófisis o ratas operadas como controles sobreviven a la infección, mientras que las ratas que no presentan la hipófisis mueren a los pocos días luego de ser infectadas (Edwards et al., 1991a). Ratas hipofisectomizadas muestran una reducción en la síntesis de anticuerpos, en las reacciones de hipersensibilidad del tipo retardada, citotoxicidad causada por las células NK y producción de IL-2 (Exon et al., 1990). La hipofisectomía en ratas inhibe además la síntesis del TNF- $\alpha$  en macrófagos estimulados *in vitro* por LPS (Edwards et al., 1991b).

Una respuesta defectiva del eje HPA a mediadores de la inflamación o inmunes, es un elemento crítico en la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades

---

inflamatorias y autoinmunes. Un ejemplo dramático de la protección llevada a cabo por los glucocorticoides sobre el sistema inmune fue reportado por Nakano et al. en 1986 (Nakano et al., 1986). Ratas adrenalectomizadas que reciben una inyección con el factor venenoso de la cobra mueren al cabo de 2,5 horas, en cambio, las ratas intactas, muestran signos leves de enfermedad luego de dicha inyección. En las ratas intactas, además, se produce un marcado aumento de los niveles de corticosterona en el suero. El pretratamiento de los animales adrenalectomizados con el agonista sintético de los glucocorticoides, la dexametasona, deja sin efecto a los efectos letales del veneno.

Otra evidencia del rol protector de los glucocorticoides en la respuesta inmune se deriva de los experimentos llevados a cabo con ratas de la cepa Lew/N las cuales son extraordinariamente susceptibles al desarrollo de artritis inducida experimentalmente (Sternberg et al., 1989a). Las ratas Lew/N tienen un defecto en la síntesis y en la secreción de la CRH hipotalámica cuando son estimuladas antigénicamente mediante la inyección de la pared de células de estreptococos. Como consecuencia se observa una reducción en la actividad del eje HPA (Sternberg et al., 1989b). 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. Cuando ratas Fisher 344/N hembras, son tratadas con el antagonista de glucocorticoides RU486, se vuelven susceptibles a la inducción de artritis por la pared de células de estreptococos, de un modo similar al observado en las ratas Lew/N.

La importancia de un eje HPA intacto también es demostrada en otros modelos de enfermedades autoinmunes. Un ej. lo constituye la EAE, modelo animal para la múltiple esclerosis humana, enfermedad caracterizada por una demielinización central. La inducción de EAE en ratas, usando homogenatos de médula espinal, lleva a la rápida elevación de los niveles de glucocorticoides en el suero; estos animales, se recuperan luego de un episodio de parálisis en las patas traseras. Las ratas adrenalectomizadas mueren luego de la inducción de EAE, el tratamiento con cortisona antes del desarrollo de la parálisis, muestra una completa recuperación de la enfermedad por las ratas adrenalectomizadas (MacPhee et al., 1989). De este modo, niveles altos de glucocorticoides son requeridos para la recuperación de estos animales de un episodio agudo de EAE.

En otro modelo animal de autoinmunidad, tiroiditis espontánea autoinmune en la cepa de pollos obesos, se encontró una reducción en los niveles de glucocorticoides libres debido a niveles elevados de la proteína transportadora de corticosteroides. El tratamiento *in vivo* con hormonas glucocorticoides normaliza la hiperreactividad de las células T y reduce significativamente la infiltración en células tiroideas (Fässler et al., 1986; Kroemer et al., 1988).

## **1.6. Resumen**

En las diferentes secciones abarcadas en esta introducción, se demuestra que:

- las interleuquinas regulan las funciones neuroendócrinas, particularmente la secreción de hormonas por el eje HPA
- las interleuquinas y sus receptores son expresados en tejidos involucrados en la regulación neuroendócrina, particularmente en la pituitaria, el hipotálamo y el hipocampo
- las hormonas del eje HPA, como los glucocorticoides, ACTH y CRH ejercen una regulación compleja de las funciones inmunes. En particular, la CRH a nivel central, juega un rol crucial en la mediación de la inmunosupresión mediada por estrés
- un sistema HPA funcionalmente intacto, es necesario para el funcionamiento adecuado del sistema inmune.

## **2. Objetivos de la investigación**

El objetivo de la presente investigación es el estudio de las características físicas y de las funciones neuroendócrinas e inmunes en un modelo animal de infusión crónica central de CRH.

### **2.1. Modelo experimental**

El modelo experimental utilizado, consiste en ratas infundidas icv, en forma crónica durante 7 días, con la hormona CRH. Mediante la infusión central de CRH se imitaría la situación de un eje HPA hiperactivo. Los objetivos que se detallan a continuación fueron llevados a cabo dentro del modelo experimental bajo dos situaciones: durante el período de infusión icv de CRH y después de transcurrido el período de infusión icv de CRH. Se eligió la inducción de la actividad del eje HPA mediante la infusión central de CRH, por las siguientes razones:

- CRH aparece como una hormona mediadora clave en la comunicación entre el sistema inmune, el sistema nervioso central y el sistema endócrino
- se encuentra un aumento de CRH endógena en situaciones de retroalimentación negativa inefectiva de las hormonas glucocorticoides a nivel del SNC (por ej. causado por una disminución en la concentración de receptores de glucocorticoides)
- la secreción central aumentada de CRH ha sido implicada en varias enfermedades mentales, como por ejemplo, en la depresión mayor, ansiedad y anorexia

### **2.2. Objetivos generales**

- establecer el impacto de una desregulación del eje HPA en el balance homeostático cerebral-endócrino-inmune.
- estudiar las interacciones inmuno-endócrinas bajo un eje HPA desregulado
- delinear los mecanismos inducidos dentro del sistema HPA o mecanismos que actúen contribuyendo a la perturbación del eje.
- estudiar el rol de factores inmunes, por ej. interleuquinas, en el funcionamiento alterado del eje HPA.



### **2.3. Objetivos específicos**

- caracterización de cambios en las características físicas
- caracterización de los cambios hormonales ocurridos en el eje HPA
- estudio de parámetros inmunes bajo un eje HPA desregulado:
  - respuesta proliferativa de esplenocitos
  - expresión de citoquinas y sus receptores a nivel del ARNm y proteico
  - análisis de las poblaciones linfocitarias

### **3. Materiales y métodos**

Todos los materiales utilizados en este trabajo, fueron adquiridos en las firmas Boehringer (Mannheim, Alemania) o Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, EEUU); salvo que se mencione el nombre de otras compañías, entre paréntesis, al lado de los productos.

#### **3.1. Modelo experimental *in vivo***

##### **3.1.1. Animales**

En el presente trabajo se utilizaron ratas Wistar macho cuyo peso varió entre los 180 y 200 g. Los animales fueron adquiridos en Charles Rivier Wiga (Sulzfeld, Alemania). Las ratas fueron mantenidas en condiciones estándar de luz y temperatura (23°C). Las horas diarias de luz fueron entre las 6.00 y las 20.00 horas. El alimento y el agua fueron disponibles *ad libitum*. En todos los casos los animales experimentales fueron utilizados una semana luego de haber llegado al bioterio para evitar la influencia de un entorno extraño en el resultado de los experimentos. Todas las operaciones realizadas fueron llevadas a cabo con el uso de halotano como anestésico (Hoechst, Francfort, Alemania). Los animales fueron pesados tanto el día de la operación como el día anterior a ser sacrificados.

##### **3.1.2. Infusión crónica icv**

###### **3.1.2.1. Minibomba osmótica**

Mediante el uso de una minibomba osmótica (Alzet, Corporación Alza, Palo Alto, California, EEUU) diseñada para su implantación en animales de laboratorio, los animales fueron infundidos crónicamente en el ventrículo cerebral derecho (figura 4). Dicha minibomba consiste en un reservorio interno donde se coloca la sustancia que se desea administrar, rodeado por un compartimento externo al cual difunden los líquidos corporales una vez que la minibomba es colocada subcutáneamente en la región dorsal de los animales. La presión ejercida por la entrada de los líquidos corporales en el compartimento externo hace que la solución contenida en el reservorio interno sea dispensada. Esta solución pasa a través de un catéter de polietileno, al cual la minibomba está conectada, a una

---

cánula de acero (Alzet, Corporación Alza, Palo Alto, California, EEUU) ubicada en el ventrículo cerebral derecho de las ratas.

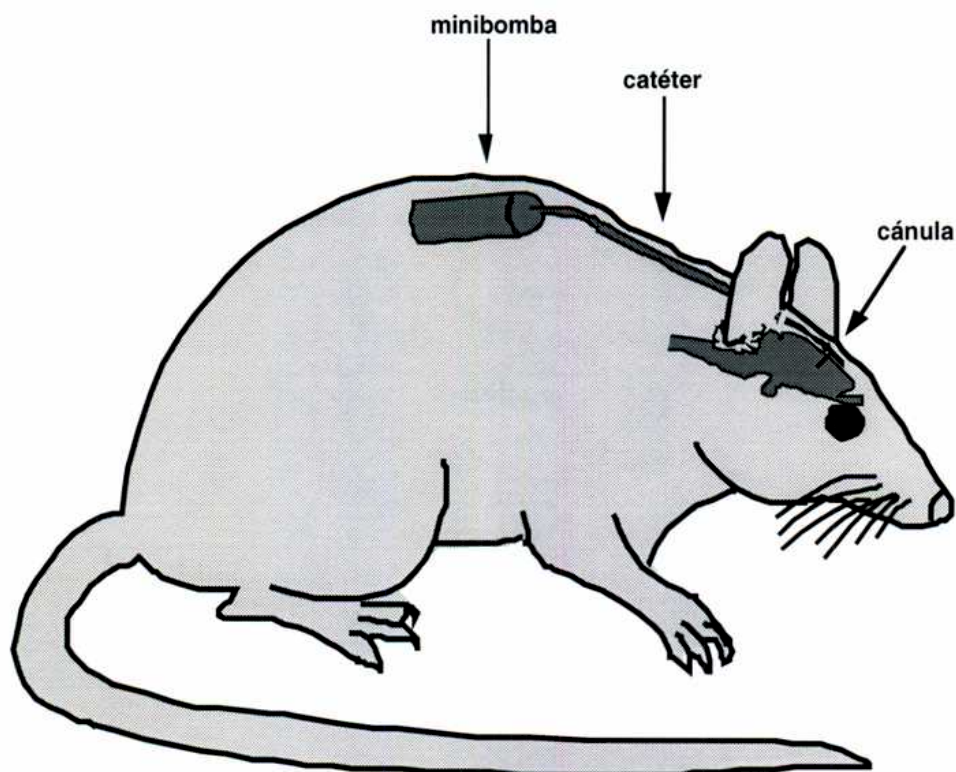
De este modo, dicho sistema osmótico libera su contenido a una velocidad de 1  $\mu$ l/hora, continuamente durante 7 días sin la necesidad de conexiones externas o el frecuente manejo de los animales. Fueron seguidos los siguientes pasos para el llenado de las minibombas osmóticas:

- se trabajó con el uso de guantes estériles para evitar el contacto de la minibomba con la grasitud de la piel, la cual podría interferir con la correcta liberación de su contenido de acumularse en la superficie
- se pesó la bomba vacía
- se llenó la bomba con la solución experimental o con el vehículo mediante el uso de una jeringa graduada de 1 ml hasta completar el volumen de la misma, el cual varió de partida en partida, manteniéndose alrededor de 230  $\mu$ l. Se pesó nuevamente la minibomba. La diferencia de pesos en miligramos es aproximadamente el mismo volumen en microlitros, el cual fue siempre mayor al 90% del volumen especificado para el reservorio. El caso contrario indicaría la presencia de aire en la bomba, el cual podría resultar en fluctuaciones impredecibles de la tasa de bombeo.
- se llenaron el catéter y la cánula con la misma solución. La bomba osmótica fue conectada mediante el catéter a la cánula.
- se colocó el sistema en solución salina al 0,9%, a 37°C, por 4 horas de modo de permitir que la bomba empezara a liberar la solución antes de su implantación en los animales experimentales. De este modo se regulariza el flujo de bombeo.

### *3.1.2.2. Implantación de la minibomba*

Por medio de la utilización de un aparato estereotáctico (Stoelting, Woodale, Illinois, EEUU), se determinó la posición exacta de implantación de la cánula de acero dentro del ventrículo cerebral derecho de la rata. Las coordenadas estereotácticas, -1,2 mm lateral y 0,5 mm anterior a bregma, fueron escogidas de acuerdo al manual de Paxinos & Watson (1986). Una vez regularizado el flujo de bombeo, se procedió a la implantación de las minibombas y cánulas en los animales. El primer grupo de animales operados fue utilizado para la corroboración de la correcta implantación de la cánula. En este caso los animales fueron sacrificados e inyectados a través de la cánula con una solución

colorante. Se removió el cerebro y se realizaron cortes transversales del mismo verificándose la posición del colorante dentro de los ventrículos cerebrales.



**Figura 4.** Modelo experimental animal. Dibujo esquemático de una rata equipada con el sistema de infusión icv.

### 3.1.2.3. Sustancias infundidas icv

Los animales fueron crónicamente administrados por 7 días en el ventrículo cerebral derecho con la CRH (Bachem, Heidelberg, Alemania). La CRH utilizada, cuya secuencia aminoacídica corresponde a la de la rata y el humano, fue producida por un sintetizador de proteínas. La CRH fue diluída en distintas concentraciones (0,1 ; 0,3 ó 1 $\mu$ g/ $\mu$ l) mediante el uso de solución salina estéril, libre de pirógenos, al 0,9%, conteniendo 0,05% de ácido ascórbico. Una vez que el péptido fue diluído, se lo alicuotó de manera de utilizar una alícuota en cada experimento. Las mismas fueron mantenidas a -80°C para conservar la

---

estabilidad del péptido. Los animales controles recibieron el vehículo, el cual estuvo constituido por el solvente utilizado en la disolución de la CRH.

### **3.1.3. Adrenalectomía**

En caso de utilizarse animales adrenalectomizados, esta operación fue realizada siempre en forma bilateral por medio de una única apertura dorsal. Los animales adrenalectomizados recibieron 0,9% de NaCl disuelto en agua corriente como bebida, para evitar una descompensación en el equilibrio salino sodio-potasio de los fluidos extracelulares a causa de la falta de aldosterona y su función mineralocorticoide. La verificación de la correcta realización de la adrenalectomía de las ratas fue realizada mediante el chequeo de la ausencia de las glándulas adrenales y por la medición de los niveles de corticosterona en el plasma mediante un ensayo radioinmunológico. La presencia de dicha hormona en los plasmas fue en todos los casos indetectable, corroborando entonces la correcta extirpación de las glándulas.

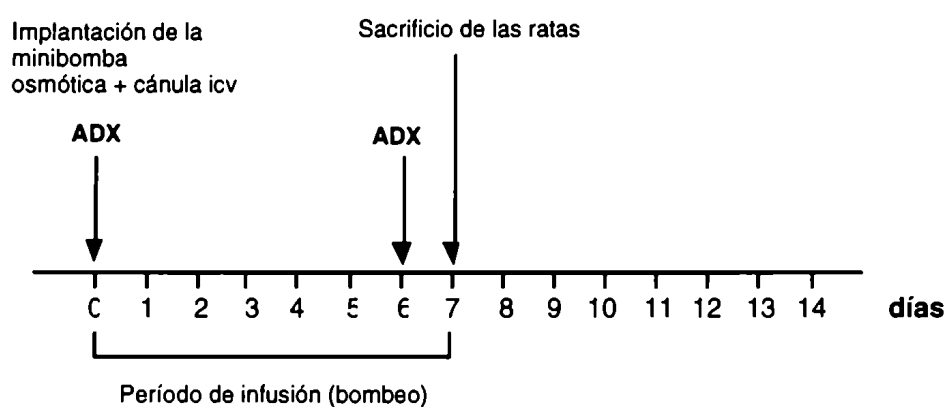
### **3.1.4. Protocolos experimentales in vivo**

Todos los animales utilizados fueron infundidos icv durante 7 días (período de bombeo) con la hormona CRH o el vehículo. En una primera serie de experimentos se determinó la concentración óptima de CRH a ser infundida. Para estos experimentos preliminares se usaron tres concentraciones diferentes de infusión: 0,1; 0,3 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$  de CRH. Los subsecuentes experimentos fueron llevados a cabo con la concentración de CRH de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$ . Los distintos grupos de animales utilizados fueron tratados y sacrificados de acuerdo al siguiente protocolo:

#### **a) *Sacrificio en el día 7 de la infusión crónica icv de CRH o el vehículo***

*(figura 5)*

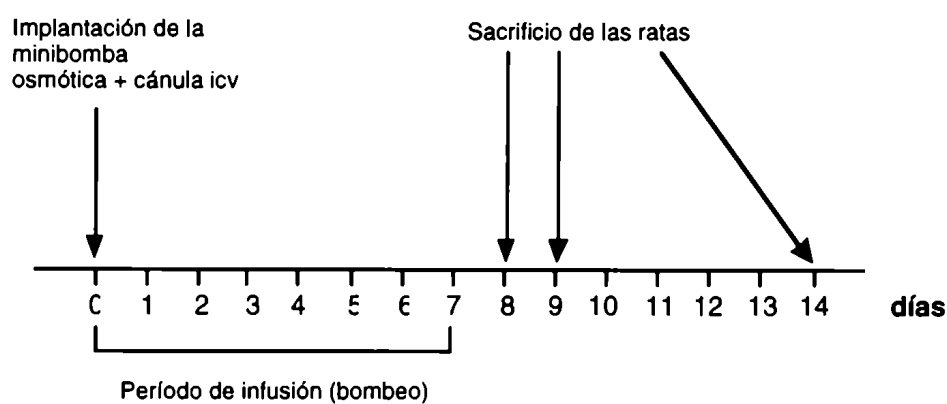
- en ratas intactas, no adrenalectomizadas
- en ratas adrenalectomizadas al mismo tiempo en que se implantó el sistema de infusión
- en ratas adrenalectomizadas en el día 6 de la infusión crónica icv



**Figura 5.** Protocolo experimental en ratas sacrificadas en el día 7 del período de infusión icv. (ADX= adrenalectomía)

b) *Sacrificio de ratas después de terminado el período de 7 días de infusión crónica icv de CRH o el vehículo (figura 6)*

- 1 día post-bombeo
- 2 días post-bombeo
- 7 días post-bombeo



**Figura 6.** Protocolo experimental en ratas sacrificadas después del período de infusión icv

---

El día del sacrificio fueron tomadas muestras de sangre y el bazo, el timo, las glándulas adrenales fueron removidos para ser pesados. El bazo fue utilizado también para posteriores experimentos (figura 7).

### **3.1.5. Experimentos neuroendócrinos**

Numerosas medidas de precaución fueron tomadas en cuenta para que las ratas no fueran perturbadas la noche anterior al experimento. Todos los experimentos neuroendócrinos fueron realizados entre las 7.00 y las 9.00 horas, que es cuando en ratas normales se detectan los niveles más bajos de ACTH y de corticosterona. Las ratas fueron anestesiadas por menos de 25 segundos en un frasco conteniendo vapor saturado de halotano, luego de lo cual los animales fueron inmediatamente sacrificados. Fueron tomadas muestras de sangre para la determinación de ACTH y corticosterona. La sangre proveniente del tronco fue colectada en tubos de 10 ml cubiertos de EDTA, anticoagulante; conteniendo además 140  $\mu\text{g}$  de aprotinina, inhibidor de proteasas (Bayer, Colonia, Alemania); y mantenidos en hielo. La sangre fue centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C, luego de los cuales se procedió a alicuotar el plasma para la posterior medición de las hormonas. Los tubos conteniendo las alícuotas del plasma fueron mantenidos a -80°C o -20°C según fuera para la determinación de la ACTH o la corticosterona, respectivamente.

## **3.2. Cultivos celulares**

### **3.2.1. Obtención de esplenocitos**

El bazo fue removido asépticamente del peritoneo de la rata y dispersado a través de una malla sintética cuyo tamaño de poro es de 40  $\mu\text{m}$ . De este modo se obtuvieron suspensiones celulares, las cuales fueron centrifugadas por 10 minutos, a 1400 rpm a una temperatura de 4°C. El pellet celular fue resuspendido en 5 ml de buffer de lisis y mantenido en hielo por 6 minutos de modo de lisar los eritrocitos. Transcurrido este lapso de tiempo se agregaron 5 ml de FBS (Gibco BRL, Eggenstein, Alemania) en el fondo del tubo, de modo de obtener dos fases. Las células fueron separadas de los fragmentos de glóbulos rojos por una centrifugación a baja velocidad (20 minutos, 480 rpm). El pellet fue resuspendido en 5 ml de medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Gibco) suplementado con 2 mM L-glutamina, 100 IU/ml penicilina,

0,1 mg/ml estreptomicina, 0,25 µg/ml anfotericina B, 50 µM β-mercaptoetanol, 25 mM HEPES y 5 % FBS inactivado por calor (30 minutos, 56°C). Se determinó entonces el número de células obtenido y la viabilidad de las mismas para luego proceder a su cultivo.

#### buffer de lisis

155 mM NH<sub>4</sub>Cl  
10 mM KHCO<sub>3</sub>  
0,1 mM EDTA

### **3.2.2. Determinación del número de células**

10 µl de la suspensión de esplenocitos fueron resuspendidos en una dilución 1:100 en la solución de conteo (1 volumen de azul de tripano y un volumen de medio de cultivo suplementado RPMI-1640). 10 µl de esta solución fueron colocados en una cámara de Neubauer para determinar el número de células. El promedio de las células contadas en los 16 cuadrantes que componen la cámara determina el número de linfocitos x 10<sup>6</sup> que se encuentran en un volumen de 1 ml. Dicho número es obtenido de acuerdo con el siguiente cálculo: la dilución empleada (x 100), el factor de la cámara (x 10) y la conversión de mm<sup>3</sup> a ml (x 1000). El total de linfocitos obtenidos se calcula mediante la multiplicación del número de linfocitos por el volumen en el cual éstos fueron resuspendidos (5 ml). Dependiendo del origen de los bazo (ratas tratadas con el vehículo o con la CRH) el número de esplenocitos varía desde 100 a 50 x 10<sup>7</sup> células/bazo respectivamente.

### **3.2.3. Determinación de la viabilidad celular**

Se determinó la viabilidad celular por medio de la coloración diferencial dada por el azul de tripano. Utilizando la dilución celular indicada en la sección anterior se determinó bajo el microscopio el número de células muertas por su coloración azul en contraste con las vivas las cuales no presentaron coloración alguna. Se contaron ambas fracciones y se calculó entonces el porcentaje de viabilidad en cada experimento. En todos ellos se obtuvo siempre un porcentaje mayor al 95 % de viabilidad.



### **3.2.4. Condiciones de cultivo celular**

Tanto para la determinación de la proliferación celular como de la secreción de linfoquinas en el sobrenadante de los cultivos de esplenocitos, se ajustó la concentración celular a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en el medio de cultivo suplementado RPMI-1640. 100  $\mu$ l de dicha suspensión celular fueron dispensados en placas estériles de cultivo de 96 pocillos con fondo plano (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Para el análisis del ARN los esplenocitos fueron resuspendidos en una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml en medio de cultivo suplementado RPMI-1640, dispensando 500  $\mu$ l por pocillo en placas de 6 pocillos de fondo plano. Para el aislamiento del ARN de las células macrofágicas, se cultivó 1 ml de células/pocillos de una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml en placas de 6 pocillos (sección 3.2.5). En el caso del análisis del IL-2R $\alpha$  sobre la superficie celular de los esplenocitos por doble-inmunofluorescencia (sección 3.4),  $5 \times 10^6$  células/pocillo fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Luego de la estimulación de los cultivos celulares (sección 3.2.6), los mismos fueron colocados en incubadora a 37°C y una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

### **3.2.5. Separación de macrófagos**

Las células macrofágicas presentan la particularidad de adherirse a placas plásticas de cultivo. De este modo, pueden ser separadas del resto de las células mononucleares no adherentes. Los esplenocitos son primeramente cultivados en placas de 6 pocillos de fondo plano (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en medio suplementado RPMI-1640, en una densidad de  $1 \times 10^7$  células/pocillo por 120 minutos. Pasado este tiempo, las células no adherentes son aspiradas y las remanentes son lavadas tres veces con PBS (Gibco) para finalmente agregar 5 ml de medio fresco suplementado. Este procedimiento es repetido por segunda vez, dejando las células en otro período de incubación de 2 horas. Finalmente se obtiene un cultivo celular altamente enriquecido en células macrofágicas (> al 95%) Dicho enriquecimiento fue verificado en trabajos previos por el método de inmunofluorescencia mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos (Arzt et al., 1988).

### 3.2.6. Estimulación de las células y tiempos de cultivo celular

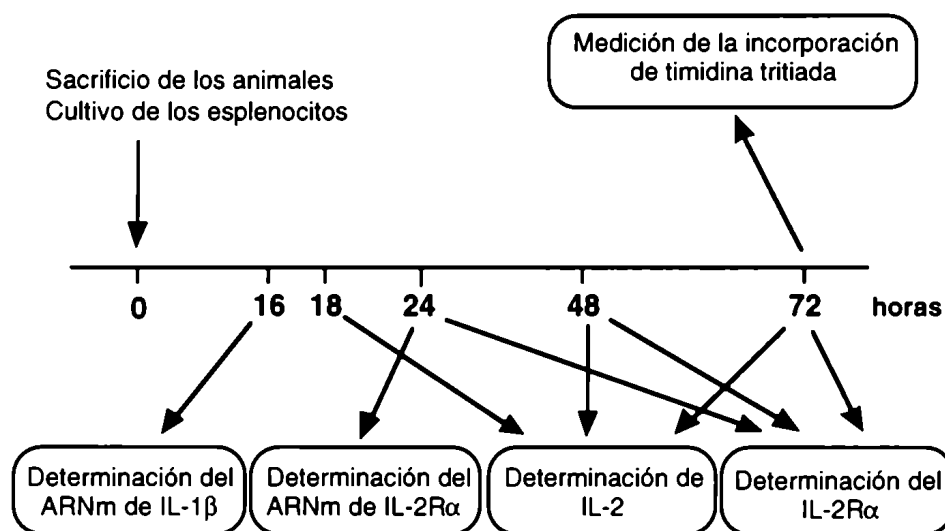
Las células fueron estimuladas con distintas concentraciones del mitógeno Con A, el cual es un estimulante de células T, o con LPS proveniente de *Salmonella abortus equii*, el cual es un mitógeno de células B de rata. Dichos productos fueron adquiridos en forma liofilizada. Se los reconstituyó en medio de cultivo RPMI-1640, se los alicuotó y congeló en  $-20^{\circ}\text{C}$  previo a su uso. En el día experimental se realizó la dilución correspondiente de los mismos en medio de cultivo suplementado RPMI-1640 y se los adicionó, según el caso, a los cultivos celulares. Las diferentes concentraciones utilizadas para la determinación de la proliferación celular fueron: en el caso del mitógeno Con A : 0,5, 1, 2 y 4  $\mu\text{g/ml}$  y en el de la endotoxina LPS: 2, 5, 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$ . Los mitógenos fueron adicionados en un volumen de 100  $\mu\text{l/pocillo}$ . A partir de la estimulación, las células son incubadas en estufa por un período de 72 horas. Se determinó entonces la proliferación de los esplenocitos.

En un set separado de experimentos, diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal OX-39 de ratón anti-receptor de IL-2 de la rata (Serotec, Oxford, Inglaterra) fueron agregados a los cultivos de esplenocitos junto con el mitógeno Con A (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Las diluciones utilizadas del anticuerpo fueron: 1:250, 1:1000 y 1:4000 en líquido ascítico. Dicho anticuerpo reconoce la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2. De este modo se produce el bloqueo de la unión de la IL-2 a su receptor en las células T activadas. En el caso del uso de dos sustancias en el mismo pocillo sin considerar las células ya adicionadas, los volúmenes fueron entonces de 50  $\mu\text{l}$  de cada una/pocillo. Debido a que el anticuerpo fue preparado en líquido ascítico, fueron realizados controles de la toxicidad del mismo para los esplenocitos. La incubación de los esplenocitos en presencia de líquido ascítico no afectó los niveles proliferativos de los mismos.

Para la medición de la IL-2 en el sobrenadante de los cultivos de esplenocitos, los mismos fueron incubados en la presencia de distintas concentraciones de Con A por 18, 48 ó 72 horas. Al cabo de dichos tiempos los sobrenadantes fueron colectados y mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su medición.

Para el estudio del ARNm de IL-2R $\alpha$ , los esplenocitos fueron estimulados con Con A; 0,5 y 1  $\mu\text{g/ml}$ , por 24 horas. Para la determinación de la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$  los esplenocitos y los macrófagos fueron estimulados con LPS en una concentración final de 2 y 10  $\mu\text{g/ml}$ , por 16 horas. En la estimulación de las células para la posterior obtención del ARN, los mitógenos fueron adicionados en un volumen de 500  $\mu\text{l/pocillo}$ . A su vez se completó a 5 ml el

volumen final de cada pocillo, mediante el agregado de medio RPMI suplementado.



**Figura 7.** Protocolo experimental *in vitro*.

Para el análisis de la presencia de IL-2R $\alpha$  en la superficie de esplenocitos, las células fueron sembradas y estimuladas por 24, 48 ó 72 horas con Con A (1  $\mu$ g/ml). Transcurrido este período, las células fueron recogidas, centrifugadas y contadas para luego ser analizadas por métodos de inmunofluorescencia.

### 3.3. Ensayo de proliferación

La proliferación de los esplenocitos fue determinada mediante la incorporación de timidina tritiada al ADN. La síntesis de ADN celular fue estudiada, como se indicó anteriormente, luego de incubar los esplenocitos, en una concentración de  $1 \times 10^5$  células /pocillo, por 72 horas en la presencia de diferentes concentraciones de Con A o LPS. Seis horas antes de la culminación de los cultivos celulares se adicionó 0,25  $\mu$ Ci de timidina tritiada (Amersham, Braunschweig, Alemania; actividad específica: 1 mCi/ml) a cada pocillo. El isótopo radioactivo

es incorporado entonces al ADN. Luego de transcurridas las últimas 6 horas de incubación, la radioactividad incorporada por las células al ADN fue recogida mediante un cosechador automático de células (Nunc-Skatron, Wiesbaden, Alemania). La misma queda adherida a filtros de papel, los cuales fueron colocados en tubos conteniendo 3 ml de solución centelladora. Los tubos fueron colocado en un contador de radioactividad  $\beta$  (Beckman, Fullerton, CA, EEUU), el cual, mediante la medición de desintegraciones radioactivas por minuto, contó las muestras durante un lapso de 3 minutos cada una.

### **3.4. Análisis por inmunofluorescencia**

Para el análisis de los distintas subpoblaciones linfocitarias,  $5 \times 10^5$  células/pocillo fueron sembradas en placas de 96 pocillos con fondo cónico. Las células fueron puestas en contacto con 100  $\mu$ l de cada anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-rata diluído 1:100 en medio mínimo esencial conteniendo 1 % sero albúmina bovina (BSA) y 0,05%  $\text{NaN}_3$ . Se las lavó dos veces con PAB (PBS conteniendo 1% BSA y 0,05%  $\text{NaN}_3$ ), y se las marcó con 100  $\mu$ l de una dilución 1:100 del anticuerpo de conejo IgG<sub>1</sub> anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC; Dianova, Hamburgo, Alemania), suplementado con 1 % de suero normal de rata inactivado. Los anticuerpos monoclonales primarios fueron: W3/13, OX 8, y W3/25 (Serotec, Oxford, Inglaterra) para la detección de las células T, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, respectivamente. La suspensión celular fue lavada dos veces con PAB y fue analizada en un FACSort (Fluorescence activated cells sorter, Becton Dickinson, Sunneyvale, CA, USA). La unión de anticuerpos no específica fue controlada mediante el marcado de las células con el anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con FITC. El marcado de las células muertas se realizó mediante la adición en el último paso de una dilución 1:100 de una solución de yoduro de propidio (1 mg/ ml PBS).

$5 \times 10^5$  células/pocillo son sembradas para el análisis del IL-2R $\alpha$ , en placas de 96 pocillos con fondo cónico. Las células fueron lavadas 2 veces con PAB. La expresión en la superficie del IL-2R $\alpha$  fue examinada en células TcR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> por inmunofluorescencia doble, con el anticuerpo monoclonal anti-IL-2R $\alpha$  (OX 39) conjugado con ficoeritrina (PE) y los anticuerpos R73 y W3/25 conjugados con FITC para las distintas subpoblaciones celulares. Anticuerpos monoclonales IgG<sub>1</sub> conjugados con PE y FITC, fueron usados como controles. Las células fueron lavadas 2 veces y analizadas en un FACSort.

### **3.5. Determinación de hormonas y citoquinas**

#### **3.5.1. Corticosterona**

La corticosterona se midió mediante el uso de un ensayo radioinmunológico (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, EEUU), el cual consiste en la medición, mediante el uso de una marca radioactiva, de la concentración de antígeno (hormona) presente en una muestra, de acuerdo a su combinación con el anticuerpo correspondiente. 100  $\mu$ l de las muestras de plasma diluido previamente 1:200, de los estándar y de los controles son puestos en contacto con la hormona marcada radioactivamente con  $I^{125}$  (200  $\mu$ l) y con el anticuerpo anti-corticosterona (200  $\mu$ l) en tubos de polipropileno. Los mismos son incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de aspirar el sobrenadante, se mide la radioactividad presente en el precipitado, en un contador gamma (Beckman, Fullerton, CA, EEUU) durante 60 segundos/muestra. La concentración de corticosterona en las muestras de plasma es calculada a partir de la curva estándar construida a partir de la medición de los precipitados (anticuerpo unido a la hormona). El coeficiente de variación entre los ensayos fue del 7,0% e intra-ensayo del 7,3%.

#### **3.5.2. ACTH**

En este ensayo radioinmunológico (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, EEUU) los volúmenes utilizados fueron: 100  $\mu$ l de la muestra, de los estándar, de los controles, del anticuerpo anti-ACTH y de la hormona ACTH marcada radioactivamente con  $I^{125}$ . El ensayo fue realizado en tubos de poliestireno y tanto los reactivos como las muestras fueron siempre mantenidos a 4°C. El método requiere una incubación a 4°C de al menos 16 horas luego de la cual, las muestras son centrifugadas, el sobrenadante aspirado y los tubos contados en un contador gamma por 2 minutos. La concentración de ACTH en las muestras de plasma es calculada a partir de la curva estándar construida a partir de la medición de los precipitados (anticuerpo unido a la hormona). El coeficiente de variación entre los ensayos fue del 7,3% e intra-ensayo del 5,1%.

### 3.5.3. IL-2

La actividad biológica de IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos estimulados con Con A fue determinada mediante el uso de un ensayo biológico. Este se basa en la proliferación de la línea celular murina CTLL-2, la cual es dependiente de IL-2 para su proliferación (Gillis et al., 1978). La línea celular es mantenida en cultivo mediante la adición de IL-2. En el momento del ensayo biológico, las células son lavadas y resuspendidas en medio suplementado RPMI-1640. Se las siembra en placas de 96 pocillos, con fondo plano, en una concentración de  $5 \times 10^3$  células/pocillo, junto con diluciones seriadas de los sobrenadantes a ser ensayados. En una incubación paralela, se construye la curva estándar mediante el uso de IL-2 recombinante murina en distintas diluciones (Becton Dickinson, Bedford, MA; actividad específica:  $1,1 \times 10^7$  U/mg de proteína). Luego de un período de incubación de 20 horas, se adiciona timidina tritiada ( $0,25 \mu\text{Ci/pocillo}$ ) a cada uno de los pocillos. Transcurridas 4 horas de incubación, las células son cosechadas y la radioactividad contenida en filtros es medida por un contador  $\beta$ . La actividad de IL-2 en cada muestra se obtiene a partir de la curva estándar. Los resultados se encuentran expresados en U/ml. Una unidad de actividad de IL-2 se define como la inversa de la dilución en la cual se alcanza el 50% de la máxima incorporación de timidina tritiada por las células CTLL-2.

## 3.6. Métodos de biología molecular

### 3.6.1. Preparación de bacterias competentes

El protocolo utilizado para la preparación de bacterias competentes se halla descrito por Mandel y Higa (1970) y Morrison (1979). Se llaman células competentes a aquellas bacterias que han sido tratadas para incorporar ADN plasmídico cuando son puestas en contacto con éste. Se utilizaron bacterias *E. coli* de la cepa HB 101 o de la cepa JM 83. Se adicionó 1 ml de cultivo bacteriano a 100 ml de medio completo Luria-Bertani (LB) sin antibiótico y se lo dejó crecer a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  hasta alcanzar una DO de 0,4 a 0,6 (cerca de 2 horas) medidos a una longitud de onda de 600 nm. Luego de transcurrido este período, las células fueron centrifugadas por 10 minutos a

2000 rpm y el sedimento fue resuspendido en buffer de calcio manteniéndolas en frío (4°C) durante 15 minutos. Se mezcló cuidadosamente y se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm a una temperatura de 4 °C. El pellet fue resuspendido en 4 ml buffer de calcio con 15% de glicerina para ser luego guardado en alícuotas de 0,2 ml en el freezer de -80°C.

#### Medio completo LB, pH 7,0

10 g triptona  
5 g extracto de levadura  
5 g cloruro de sodio  
Completar a 1 litro con agua bidestilada y autoclavar.

#### Buffer de calcio, pH 7,8

1 mM Tris  
50 mM CaCl<sub>2</sub>

### **3.6.2. Transformación y crecimiento bacteriano**

Se llama transformación al proceso por el cual se introduce en una bacteria que fue hecha competente, ADN plasmídico para su amplificación.

Se descongelaron alícuotas de bacterias competentes sobre hielo para luego proceder a la transformación bacteriana mediante 50 ng de ADN plasmídico ( 5 - 30 µl). Se utilizaron cultivos de bacterias de la cepa HB 101 para la transformación con el vector pBR 322 o de la cepa JM 83 para los plásmidos CDM8 y Bluescribe. El ADN plasmídico fue adicionado mezclando cuidadosamente. Luego de incubar las bacterias en proceso de transformación por 30 minutos en hielo, se procedió a darles un choque de calor durante 5 minutos a 42°C para luego dejarlas a temperatura ambiente por 10 minutos. Transcurrido este tiempo se les agregó 800 µl de medio LB sin la presencia de antibiótico y se les incubó por un período de 1 a 2 horas en baño a 37°C con agitación (Cohen et al., 1972). Transcurrido este tiempo se tomaron 500 µl de bacterias, y se los sembró en placas de agar conteniendo el medio de selección específico (ampicilina).

---

### Placas de agar en medio completo LB, pH 7,0

10 g	triptona
5 g	extracto de levadura
5 g	cloruro de sodio
15 g	agar

Completar a 1 litro con agua bidestilada y autoclavar. Dejar enfriar hasta alcanzar una temperatura entre 50 y 60 °C y agregar entonces el antibiótico correspondiente (ampicilina en una concentración final de 50 µg/ml); volcar el agar en placas de Petri y dejar solidificar.

Al día siguiente una colonia de bacterias fue tomada mediante un ansa estéril y fue colocada en un tubo de ensayo conteniendo 5 ml del medio completo LB más el antibiótico. El mismo fue adicionado en la concentración detallada en el párrafo anterior. Nuevamente se dejaron crecer los tubos durante la noche a 37°C. Luego de este período de tiempo, el contenido fue colocado en 0,5 l de medio LB más antibiótico. En el caso de utilizar el plásmido pBR 322 para la transformación bacteriana, la DO del cultivo fue medida bajo una longitud de onda de 600nm. Una vez determinada una DO entre 0,6 - 0,8, se adicionó al cultivo cloranfenicol, en una concentración final de 100 mg/ml, con el fin de aumentar el número de copias del plásmido, ya que el vector pBR 322 tiene la característica de tener un bajo número de copias. Luego de la estimulación mediante la adición de Cloranfenicol, el cultivo bacteriano se trató en las mismas condiciones que los cultivos que contuvieron otros vectores: se los dejó crecer durante la noche a 37°C. Al día siguiente se tomó una alícuota de las bacterias transformadas y se las mezcló con 15% de glicerina. Las bacterias fueron mantenidas a -80°C para ser utilizadas en futuros aislamientos del ADN plasmídico. El resto del medio conteniendo el cultivo bacteriano fue centrifugado durante 10 minutos a 4°C con una velocidad de 6000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21 M/E cuyo rotor fue JA-10.

### **3.6.3. Aislamiento del ADN**

#### *3.6.3.1. Aislamiento del ADN plasmídico*

Para aislar el ADN plasmídico se utilizó un kit comercial el cual está basado en el método de extracción alcalina desarrollado por Birnboim (1983). 500 ml de un



cultivo bacteriano crecido en medio líquido fue centrifugado de modo de obtener un pellet bacteriano, el cual fue resuspendido en 10 ml de buffer P1. Se agregaron, luego, 10 ml de buffer P2 rotando el tubo cuidadosamente. Se obtuvo mediante el uso de ambos buffers, un lisado celular. El SDS (dodecil sulfato de sodio) desnaturizó las proteínas celulares, mientras que las condiciones alcalinas desnaturizaron el ADN plasmídico y bacteriano. El tiempo de lisis fue optimizado de modo de permitir una máxima liberación del plásmido sin una completa lisis celular lo cual hubiera generado la liberación del ADN cromosómico. El lisado fue entonces neutralizado con 10 ml de buffer P3 durante 10 minutos en hielo. La alta concentración salina de dicho buffer causó la desnaturización de las proteínas, ADN cromosómico, restos celulares y la precipitación del SDS, mientras que el ADN plasmídico se anilló nuevamente y permaneció en solución. Durante este tiempo se produjo además la ruptura del ARN por el agregado de ARNasa A contenida en el buffer P1. Los restos celulares fueron removidos mediante una centrifugación por 30 minutos a 15000 rpm con una temperatura de 4°C. El sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico fue transvasado a un tubo de 50 ml para ser nuevamente centrifugado por 30 minutos a 3500 rpm y 4°C. Se equilibró la columna conteniendo la resina, con 10 ml de buffer QBT, la presencia de detergente en el buffer redujo la tensión superficial y ayudó a alcanzar una velocidad de flujo apropiada. Se agregó el lisado acompañado de 60 ml del buffer de lavado QC. Las condiciones de salinidad y de pH aseguraron que el ADN plasmídico quedara retenido en la resina mientras que el ARN degradado, las proteínas celulares y los metabolitos no. El ADN plasmídico fue entonces eluído por el agregado de 15 ml de buffer QF, de alto contenido salino, a la columna. Se precipitó el mismo con 0,7 volúmenes de isopropanol, mantenido a temperatura ambiente, para evitar la coprecipitación de las sales. Luego se lo centrifugó por 60 minutos a 3000 rpm, a 4°C. Finalmente el pellet fue resuspendido en 80% etanol para eliminar así las últimas trazas de sal, luego de lo cual se lo dejó secar al aire. Se resuspendió el pellet ya seco con un volumen de 250 - 500 µl de buffer TE para medir el contenido plasmídico en un fotómetro a una densidad óptica de 260 nm (1 DO corresponde a 50 µg/ml ADN). Alrededor de 1 mg de ADN plasmídico fue obtenido mediante este método. De 500 a 1000 ng de ADN plasmídico fueron directamente corridos en un gel de agarosa para verificar la presencia del plásmido (sección 3.6.3.3.).

Buffer P1, pH 8,0

50 mM Tris/HCl  
 10 mM ácido etilendiamino-  
 tetraacético (EDTA)  
 100 µg/ml ARNasa A

Buffer P2

0,2 M NaOH  
 1 % SDS

Buffer P3

3,0 M acetato ácido  
 de potasio

Buffer QBT, pH 7,0

750 mM NaCl  
 50 mM MOPS  
 15 % etanol  
 0,15 % tritón-X

Buffer de lavado QC, pH 7,0

1 M NaCl  
 50 mM MOPS  
 15 % etanol

Buffer QF, pH 8,5

1,25 M NaCl  
 50 mM Tris/HCl  
 15 % etanol

Buffer TE, pH 8,0

10 mM Tris/HCl  
 1 mM EDTA

*3.6.3.2. Escisión enzimática del ADN*

El ADN plasmídico fue ajustado a una concentración de 20 - 2000 ng/µl. Se tomaron volúmenes de entre 20 a 400 µl del plásmido para cortarlos enzimáticamente y obtener el templado de interés. La concentración enzimática utilizada fue de 1 - 10 U/µg de ADN. La mezcla de ADN con la enzima fue incubada por 2 horas a 37°C en la presencia del buffer de reacción (Pharmacia, Friburgo, Alemania). Una vez transcurrido este período, la reacción enzimática fue detenida por el agregado de 1/2 volumen de buffer de corrida SDS. Dos tipos de templados fueron así obtenidos de acuerdo a los plásmidos utilizados: fragmentos de ADN separados del ADN plasmídico por medio de la escisión enzimática o plásmidos linearizados conteniendo el templado. El ADN es corrido entonces inmediatamente en un minigel de electroforesis para verificar

la presencia del fragmento deseado o del plásmido linearizado conteniendo el templado de interés (sección 3.6.3.3.).

Los templados utilizados en el presente trabajo fueron donados por el Dr. Dan Lindholm, Max Planck Institute of Psychiatry, Theoretical Institute, Martinsried, Alemania, clon de ADNc no publicado (IL-1 $\beta$  de rata); Dr. James L. Roberts, Fishberg Center in Neurobiology, Mount Sinai School of Medicine, Nueva York, EEUU, (Roberts et al., 1979; ADNc de POMC de ratón); Dr. Margaret Dallman, Nuffield Department of Surgery, John Radcliffe Hospital, University of Oxford, Oxford, Inglaterra (Page & Dallman, 1991; ADNc del IL-2R $\alpha$  de rata) y Dr. Martin Lipp, Genzentrum, Munich, Alemania (ADNc de actina de pollo). Los ADNc de IL-1 $\beta$  de rata (500 pb) y de POMC de ratón (140 pb), ambos insertados en el vector Bluescribe fueron linearizados mediante el uso de las enzimas de restricción HindIII y BamHI, respectivamente, para el posterior marcado radioactivo con  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-rUTP utilizando el método de transcripción *in vitro*. El fragmento de ADNc del IL-2R $\alpha$  (1,1 kb) de rata fue aislado mediante la utilización de la enzima HindIII del vector CDM8 . El templado de ADNc de  $\beta$ -actina (1 kb) fue generado por el uso de la enzima PstI. Ambos fragmentos fueron obtenidos de acuerdo al método indicado en la sección siguiente.

#### buffer de corrida SDS

10 mM	Tris pH 8,0
50 mM	EDTA
1 %	SDS
0,1 mg/ml	azul de bromofenol
30 %	glicerina

#### *3.6.3.3. Corrida en gel de agarosa del ADN para la separación y aislamiento del fragmento deseado*

Tanto el plásmido como los productos de la escisión enzimática del ADN son corridos en un minigel de agarosa al 1,1%. La agarosa fue disuelta en 100 ml de buffer TBE a 100°C. Se la dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 60°C para luego agregarle 20  $\mu$ l de bromuro de etidio. Se volcó la mezcla dentro del contenedor correspondiente (5 mm de alto x 50 mm de ancho x 75 mm de largo) donde se lo dejó solidificar por alrededor de 1 hora para permitir la polimerización de la agarosa. El plásmido y los productos de la digestión del ADN

plasmídico fueron preparado para la corrida electroforética mediante la adición de 1/2 volúmenes de buffer de corrida SDS. Junto con dichas muestras, fueron también corridos dos diferentes marcadores de tamaño molecular (1 kb y 123 pb) para poder identificar el tamaño de las bandas de ADN obtenidas luego de la corrida electroforética y verificar que correspondan con el tamaño del templado indicado en el mapa de restricción del plásmido. La corrida fue realizada a 90 V con una corriente de 60 mA por alrededor de 1 - 1,5 horas. Las bandas de ADN fueron analizadas bajo luz UV (254 nm) y fotografiadas por medio del uso de una cámara Polaroid. El plásmido linearizado es entonces directamente sometido a una extracción fenólica (sección 3.6.3.4.). Una vez verificado el corte enzimático y el tamaño apropiado de los fragmentos de ADN se procedió a la corrida de los mismos pero en un gel preparado con agarosa de bajo punto de fusión, el cual permitió su posterior aislamiento. La separación del fragmento de ADN, del ADN plasmídico, se realizó en dicho gel preparado al 1 - 1,5%. Se siguió el método de aislamiento de fragmentos de ADN diseñado por Maniatis et al. (1989). Luego de la corrida electroforética se obtuvo una separación suficiente de los distintos fragmentos de ADN, los cuales fueron observados bajo luz UV. El fragmento de interés fue cortado del gel mediante el uso de un escalpelo, siempre bajo luz UV, y luego colocado en un tubo de reacción. Los trozos de agarosa conteniendo el ADN son calentados a 65°C por 15 minutos de manera de fundir la agarosa y así permitir la extracción del ADN.

#### buffer TBE:

100 mM borato  
10 mM EDTA  
25 mM Tris/HCl, pH 8,0

#### *3.6.3.4. Extracción y concentración del ADN*

Tanto el plásmido linearizado con el templado de interés como el fragmento aislado del gel de agarosa fueron extraídos para la separación del ADN de las proteínas, como por ej. nucleasas y enzimas. Se agregó 1 volumen de fenol al ADN, se lo centrifugó, se adicionó luego 1 volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25 : 24 : 1), nuevamente se lo centrifugó, para finalmente agregar 1 volumen 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 es removida y colocada en un nuevo tubo de reacción. Luego de realizada la extracción se agregó 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M más 2,5 volúmenes de etanol absoluto. El tubo se colocó por 15 a 60 minutos a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El pellet fue luego recuperado por una centrifugación por 20 minutos a 12000 rpm. Se lo lavó con etanol al 80% mantenido en  $-20^{\circ}\text{C}$ , se lo dejó evaporar y se lo disolvió finalmente en buffer TE autoclavado.

Fenol: solución saturada en 10/1 buffer TE

### 3.6.4. Reacciones enzimáticas en el ADN

#### 3.6.4.1. Marcación *in vitro* del ADN mediante $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP

Fue utilizado el método de marcación "random oligonucleotide priming" desarrollado por Feinberg y Vogelstein (1983). Una mezcla de hexanucleótidos se hibridiza con el ADNc a ser marcado. La cadena complementaria es sintetizada por el fragmento Klenow de la polimerasa a partir de los "random priming" adicionados. Para el marcado de los fragmentos de  $\beta$ -actina y del IL-2R $\alpha$  fue utilizado un kit de la firma Boehringer. 25 - 100 ng del fragmento de ADN (9  $\mu\text{l}$ ) fueron hervidos durante 5 minutos en un baño de agua e inmediatamente después puesto en una cubetera conteniendo hielo. Se agregaron entonces: 2  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción (hexanucleótidos disueltos en buffer-Klenow 10 x), 3  $\mu\text{l}$  de una solución de dNTP (0,5 M de dATP, dGTP y dTTP) y 5  $\mu\text{l}$  de  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP (10  $\mu\text{Ci/ml}$ , 3000 Ci/mol). La reacción se realizó por incubación de la mezcla por 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  con el previo agregado de 1  $\mu\text{l}$  (2 U) del fragmento Klenow de la polimerasa.

Una vez transcurrido este período de tiempo la reacción fue detenida por el agregado de 2  $\mu\text{l}$  de EDTA 0,2 M. El dCTP no incorporado fue separado de la mezcla por centrifugación en una columna de Sephadex G50 (Pharmacia) con el agregado de buffer TES. La columna fue preparada utilizando una jeringa de 1 ml y rellena con Sephadex G50 saturado con agua y luego autoclavado. La actividad específica del ADN obtenido fue de 2 - 4 x  $10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$  ADN.

### Buffer TES

10 mM Tris  
1 mM EDTA  
100 mM NaCl

#### 3.6.4.2. *Marcación con $\gamma$ -<sup>32</sup>P-UTP a través del método de transcripción in vitro*

La síntesis de sondas simple-cadena de ARN fue obtenida gracias a la ayuda de promotores derivados de bacteriófagos (SP6, T3, o T7) presentes en los plásmidos utilizados (Green et al., 1983; Tabor & Richardson, 1985). Los plásmidos fueron linearizados mediante el uso de enzimas de restricción, son marcados con radioactividad mediante el uso de un kit de la firma Stratagene (La Jolla, EEUU) de transcripción *in vitro*. Las sondas preparadas siguiendo este método fueron los ADNc de IL-1 $\beta$  y de POMC. Se incubó a 37°C por 1 hora, 1  $\mu$ g de ADN plasmídico linearizado, con 1  $\mu$ l (10 U/ $\mu$ g ADN) de ARN polimerasa T3 dependiente de ADN, 3  $\mu$ l de solución de NTP (0,5 M de ATP, CTP y GTP), 50  $\mu$ Ci de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-UTP (10  $\mu$ Ci/ml, 3000 Ci/mol), 1  $\mu$ l de ditionitrietol 0,75 M, 1  $\mu$ l de inhibidor de ARNasa, 5  $\mu$ l de buffer de transcripción 5 x, completando un volumen de 25  $\mu$ l con agua autoclavada bidestilada. El transcripto de ARN fue separado del UTP marcado no incorporado utilizando una columna de Sephadex como ya fue descrito en el punto anterior. El marcado a través de la transcripción *in vitro* dio como resultado un ARNc con una actividad específica de 2 - 5 x 10<sup>7</sup> cpm/ $\mu$ g ADN.

### 3.6.5. **Aislamiento y análisis del ARNm de células**

#### 3.6.5.1. *Aislamiento del ARN total*

El ARN total de la pituitaria anterior, esplenocitos y de cultivo de esplenocitos y macrófagos, fue aislado cuidadosamente para evitar la degradación del ARN por ARNasas, siguiendo el método de Chomczynski y Sacchi (1987).

Una vez sacrificados los animales, la pituitaria fue inmediatamente removida y colocada en un tubo de reacción perforado y sumergida en nitrógeno líquido, para luego ser guardada a -80°C hasta su posterior utilización. El ARN total de dicho tejido, al igual que el de 20 x 10<sup>6</sup> esplenocitos obtenidos directamente del procesamiento del bazo, fue conseguido mediante la homogenización de las

células en la presencia de solución de tiocianato de guanidina (3 ml o 5 ml respectivamente). Dicha solución permitió la lisis celular sin que el ARN fuera degradado por la acción de las ARNasas. En el caso de los cultivos celulares (esplenocitos o macrófagos), se recogieron las células de las placas de cultivo por raspado de los pocillos, obteniéndose también así las células adherentes. Se traspasó el contenido de los pocillos a un tubo, el cual se centrifugó a 4°C, por 10 minutos a 1400 rpm. Se descartó el medio y se homogeneizaron las células en la presencia de la solución de tiocianato de guanidina. El ARN fue posteriormente extraído por el agregado de 1/10 volumen de acetato de sodio 2 M (pH 4), 1 volumen de fenol y 1/5 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (49 : 1). Luego de una centrifugación por 20 minutos a 15000 rpm a 4°C la fase acuosa, superior, fue tomada y el ARN fue precipitado con 1 volumen de isopropanol por al menos 1 hora a -20°C. El precipitado de ARN fue obtenido por centrifugación a 15000 rpm por 30 minutos a 4°C. Fue nuevamente resuspendido en 300 µl de solución de tiocianato de guanidina y 300µl de isopropanol para ser luego guardado por al menos 1 hora a -20°C. Se lo centrifugó en las mismas condiciones indicadas anteriormente y se lo lavó con etanol al 80 %, se lo secó y resuspendió en 25 µl de agua conteniendo dietilpirocarbonato (DEPC). La cantidad de ARN total así obtenido, fue determinada mediante la lectura del mismo en un fotómetro a una longitud de onda de 260 nm (1 DO a 260 nm corresponde a 40 µg/ml de ARN).

#### Solución de tiocianato de guanidina

4 M tiocianato de guanidina  
25 mM citrato de sodio, pH 7,0  
0,5 % N-lauril-sarcosil  
0,1 M 2-mercaptoetanol

#### *3.6.5.2. Separación del ARN en gel de agarosa*

Dos métodos distintos de separación del ARN fueron utilizados. Uno, basado en la separación electroforética de las moléculas de ARN en un gel de glioxal no desnaturizante. Este es una adaptación del método de McMaster y Carmichael (1977). El ARN fue previamente desnaturizado mediante el uso de glioxal. 20 µg de ARN son disueltos en 12 µl de agua tratada con DEPC y desnaturizados por 1 hora a 50°C en un baño de agua mediante el uso de 6 µl de una solución

de glioxal y 18  $\mu$ l de DMSO. Luego del agregado de 2  $\mu$ l de buffer de coloración, el ARN es colocado en el gel de agarosa. El porcentaje de agarosa en el gel fue del 1,2%. El mismo fue preparado del siguiente modo: la agarosa fue disuelta en 300 ml de buffer de corrida (10 mM fosfato de sodio) a una temperatura de 100°C. Una vez que su temperatura disminuyó hasta los 60°C se volcó cuidadosamente la agarosa sobre la cubeta dejándola solidificar. La corrida electroforética se realizó a 130 V y 80 - 120 mA por 4 - 6 horas en buffer de corrida 10 mM de fosfato de sodio. Para mantener el pH constante durante la corrida, el buffer es bombeado continuamente desde el cátodo hacia el ánodo.

#### 1 M buffer fosfato de sodio, pH 6.5

1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

#### Buffer de coloración

0,25 % azul de bromo fenol  
0,25 % xileno-cianol

#### Solución de glioxal

127  $\mu$ l glioxal deionizado  
8  $\mu$ l buffer fosfato de sodio 1 M

El segundo método de corrida electroforética utilizado, fue desarrollado por Maniatis et al. (1989). Para este método 20  $\mu$ g de ARN fueron resuspendidos en 5  $\mu$ l de agua tratada con DEPC y 20  $\mu$ l de solución desnaturante de las muestras. Se lo incubó a 60°C por 15 minutos y luego colocándolo sobre hielo, se lo trató con 10  $\mu$ l de buffer de coloración. Se lo colocó en un gel desnaturante conteniendo: 1% agarosa, 15% formaldehído al 37%, 75% agua bidestilada y 10% buffer de corrida 10 x. Se disolvió la agarosa dejándola hervir en el agua junto con el buffer de corrida 10 x. Se la dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 65°C y se le agregó entonces el formaldehído. Se dejó solidificar la mezcla en la cuba de electroforésis. La corrida electroforética se realizó en las condiciones indicadas anteriormente o por 14 horas a 27 V en buffer de corrida 1 x.



Buffer de corrida 10 x , pH 6,8 - 7,2:

10,76 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - H<sub>2</sub>O

17,32 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Agregar agua bidestilada hasta 1000 ml y autoclavar.

Buffer desnaturizante 10 X , pH 7,0:

4,7 g Hepes

0,69 g acetato de sodio

0,37 g Na<sub>2</sub>EDTA

Agregar agua bidestilada hasta 100 ml y filtrar.

Solución desnaturizante de las muestras:

120 µl buffer desnaturizante 10 x

600 µl formamida al 98%

195 µl formaldehído al 37%

85 µl H<sub>2</sub>O bidestilada

Preparar inmediatamente antes de ser usada

Buffer de coloración:

1 ml buffer de corrida 10 x

5 ml glicerol

4 ml H<sub>2</sub>O bidestilada

1 mg bromuro de etidio

5 ml azul de bromofenol

Mezclar y filtrar.

### 3.6.5.3. *Transferencia del ARN del gel de agarosa a membranas de Nylon*

Luego de la corrida electroforética, se procedió a la transferencia del ARN contenido en el gel de agarosa a una membrana de nylon, mediante el uso de un sistema de transferencia por vacío. La membrana fue previamente embebida en el buffer de transferencia 10 x SSC. La transferencia se realizó a una presión de 50 mbar durante al menos 2 horas. Se enjuagó la membrana en buffer 2 x SSC y el ARN transferido se fijó a la membrana de Nylon mediante su exposición a UV (Stratalinker, Stratagene) a 1,200 joules/cm<sup>2</sup>.

## 20 x SSC

3 M NaCl  
0,3 M tri-citrato de sodio dihidratado

Para chequear la eficiencia de la transferencia, la integridad del ARN y la posición del ARN ribosomales de 28S y 18S, la membrana fue sumergida en una solución de acetato de sodio 0,5 M con 0,04% de azul de metileno por 10 minutos. Se enjuagó luego la membrana en agua bidestilada por 10 minutos y se verificó entonces la presencia de los ARN ribosomales de 28S y 18S. Se sacó una fotocopia de dicha tinción para poder luego determinar el tamaño del ARNm que hibridiza con la sonda radioactiva por comparación con los tamaños de los distintos ARN ribosomales.

### *3.6.5.4. Hibridización del ARN unido a la membrana*

Las membranas fueron prehibridizadas por al menos 4 horas a 42°C, en una solución de prehibridización que bloqueó los sitios inespecíficos de la misma. Luego se las hibridizó por la adición del templado marcado, el cual, en caso de ser ADNc fue previamente desnaturalizado hirviéndolo por 10 minutos, mientras que cuando fue ARNc se agregó directamente (10000 cpm de radioactividad/cm<sup>2</sup> de superficie de la membrana). La hibridización se realizó durante una noche. Finalmente la membrana fue lavada dos veces, 15 minutos cada vez, a temperatura ambiente en una solución de 2 x SSC, solución SDS 0,1% , luego durante 30 minutos a 37°C en 1 x SSC, solución SDS 0,1%, para terminar con un lavado en 0,1 x SSC, solución de SDS 0,1% por 30 minutos durante 2 horas, a una temperatura de 42 a 65°C dependiendo de la sonda utilizada. Las membranas fueron, entonces, expuestas en casetes de exposición para radiografías, sobre una radiografía virgen a -80°C, por 1 a 15 días, en función de la intensidad de la señal. Una vez revelada la autoradiografía por una máquina de revelado automático (X-ray film processor XP2000, 3M, Munich, Alemania), se estimó el tamaño de las señales obtenidas por comparación con el ARN ribosomal y se verificó de este modo que las señales de ARNm aparecido en la radiografía fueran las correspondientes a la sonda usada. Las señales obtenidas para las ratas tratadas con el vehículo o con la CRH son comparadas entre sí a través de sus intensidades. Las distintas intensidades son obtenidas por la lectura de las mismas en un analizador de imágenes (BioScan Optimas image analyzer, Edmonds, WA, EEUU). Las intensidades se

expresan como la DO x área. Los resultados se presentan como la relación entre la intensidad del ARNm de interés y la de la  $\beta$  actina.

La membrana, una vez utilizada, fue lavada para despegar la sonda radioactiva por medio de un buffer de rehibridización a temperaturas mayores a 80°C por al menos 1 hora. Se las expuso entonces a una autoradiografía para corroborar la efectividad del lavado. Las membranas fueron entonces rehibridizadas con la sonda de interés. En general la segunda hibridización se realizó con la sonda radioactiva de actina como control de la cantidad de ARNm presente en cada calle.

#### 20 x SSPE

3,6 M NaCl  
0,2 M buffer fosfato de sodio  
20 mM EDTA

#### 100 x Denhardt's:

2 % BSA  
2 % ficoll 400  
2 % polivinilpirrolidona

#### Solución de prehibridización

50 % formamida deionizada  
5 x SSPE  
5 x Denhardt's  
0,1 mg/ml ADN de esperma de salmón desnaturalizado  
0,1 % SDS

#### Buffer de rehibridización

5 ml 100 x Denhardt's  
5 ml 1 M Tris pH 7,5  
4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0  
agregar 1000 ml de agua bidestilada

### 3.7. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  ES. La letra n representa el número de animales en cada grupo experimental. En ciertas figuras se indica por ej. n = 8 a 9, correspondiendo a distintos números de animales tratados con el vehículo o con la CRH.

El test de la T de student fue aplicado para revelar diferencias significativas entre los valores de ACTH, corticosterona, el aumento del peso corporal, los pesos del timo y del bazo obtenidos en ratas infundidas con CRH o con el vehículo y sacrificados en el día 7 del período de infusión. Las diferencias significativas en el caso de los ensayos de proliferación, producción de IL-2 y expresión del IL-2R $\alpha$  fueron determinadas mediante el análisis de varianza (2 ways ANOVA), acompañado del test de rango múltiple de Duncan en los casos apropiados. El análisis de varianza incluyendo comparaciones post hoc mediante el test de rango múltiple de Duncan fue también utilizado para testear las diferencias significativas en el aumento de peso corporal, peso del bazo y del timo, valores de ACTH y de corticosterona cuando estos fueron comparados en función de los distintos días post-bombeo. La P <0,05 fue aceptada como el nivel de significación. En el caso del análisis de la expresión del ARNm por Northern blot, solamente se muestra una estadística descriptiva.

## 4. Resultados

### 4.1. Concentración óptima de CRH

Con el fin de estudiar las interacciones funcionales entre el sistema inmune y el sistema neuroendócrino bajo condiciones de una eje HPA alterado, los animales fueron infundidos icv en forma crónica durante 7 días con la hormona CRH o con el vehículo. En un primer set de experimentos se determinó la concentración óptima de CRH a ser infundida de acuerdo a los cambios observados en el eje HPA y paralelamente en el sistema inmune. Las ratas fueron infundidas icv con el vehículo o con tres diferentes concentraciones de CRH: 0,1; 0,3 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$ . Los animales fueron sacrificados en el día 7 de la infusión. Se midieron los niveles plasmáticos de las hormonas ACTH y corticosterona. Se estudió en paralelo la respuesta proliferativa de los esplenocitos estimulados, *in vitro*, con el mitógeno de células T, Con A. En la tabla 3 se observan los valores hormonales plasmáticos obtenidos en los animales infundidos con cada concentración de CRH y con el vehículo.

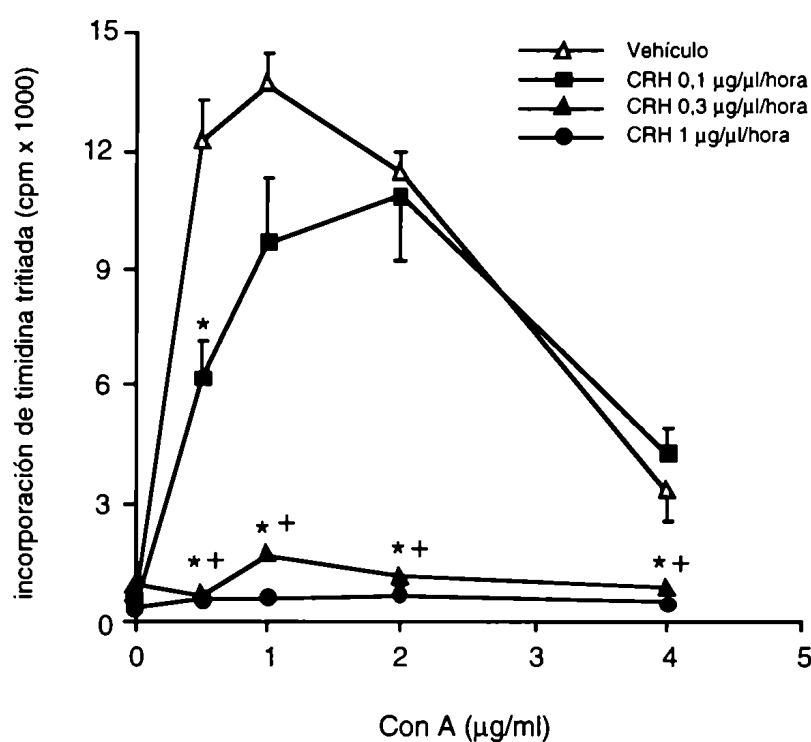
**Tabla 3.** Efecto de la infusión crónica icv de distintas concentraciones de CRH sobre los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona.

Tratamiento	ACTH (pg/ml)		corticosterona ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )	
Vehículo	34,5 $\pm$ 5,6	(3)	0,2 $\pm$ 0,1	(3)
CRH 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$	213,3 $\pm$ 84,9	(3)	5,9 $\pm$ 1,9	(3)
CRH 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$	231,0 $\pm$ 48,2 *	(3)	12,1 $\pm$ 6,5	(3)
CRH 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$	142,0 $\pm$ 20,6 *	(3)	12 $\pm$ 1,6 *	(3)

El número de animales en cada grupo experimental se indica entre paréntesis. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  ES. \*,  $P < 0,05$  (CRH vs. vehículo), test de la *t* de Student.

En la figura 8 se muestra la proliferación de las células T estimuladas *in vitro* por Con A, para cada concentración de CRH elegida. Los valores de ACTH en

plasma son significativamente diferentes en los animales infundidos con 0,3 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$  de CRH respecto de los tratados con el vehículo. Sin embargo para corticoste-rona solamente las ratas infundidas con la concentración más alta de CRH muestran diferencias significativas respecto de los vehículos. Por otro lado, en el ensayo de proliferación, se observó una total supresión de los niveles prolife-rativos de los linfocitos provenientes de las ratas infundidas con 0,3 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$ . Las ratas tratadas con 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$  de CRH no muestran diferencias significativas respecto de las infundidas con el vehículo para las concentraciones óptimas de Con A utilizadas como estímulo mitogénico de los esplenocitos.



**Figura 8.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH en distintas concentraciones y del vehículo sobre la proliferación de esplenocitos. Los datos se presentan como curvas dosis-respuesta de Con A. La proliferación de los esplenocitos se expresa como la incorporación de timidina tritiada en cpm (promedio  $\pm$  ES,  $n = 3$ ). ANOVA: efecto de la concentración de Con A:  $F(4, 40) = 52,725$ ,  $P < 0,0005$ ; efecto del tratamiento:  $F(3,40) = 151,026$ ,  $P < 0,0005$ . \*,  $P < 0,05$  (CRH 0,1; 0,3 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$  vs. vehículo), +,  $P < 0,05$  (CRH 0,3 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$  vs. 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$ ), test de Duncan de rango múltiple.

Así, se decidió extender la caracterización de este modelo animal, utilizando solamente la concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$  de CRH como concentración óptima de infusión. La falta de diferencias significativas entre la proliferación de

esplenocitos provenientes de ratas infundidas icv con 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$  de CRH o con el vehículo y, por otra parte, la gran variación en los niveles plasmáticos de corticosterona obtenidos para la concentración de CRH intermedia (0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$ ), llevaron a descartar el posterior uso de dichas con-centraciones. Pese a que la proliferación celular en los animales infundidos con la concentración de 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$  de CRH estuvo drásticamente afectada, se optó por la concentración de CRH más alta para estar, con seguridad, en la situación de un eje HPA hiperactivo.

## 4.2. Efectos de la infusión crónica icv de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$ de CRH en ratas sacrificadas en el día 7 del período de infusión

### 4.2.1. Ratas no adrenalectomizadas

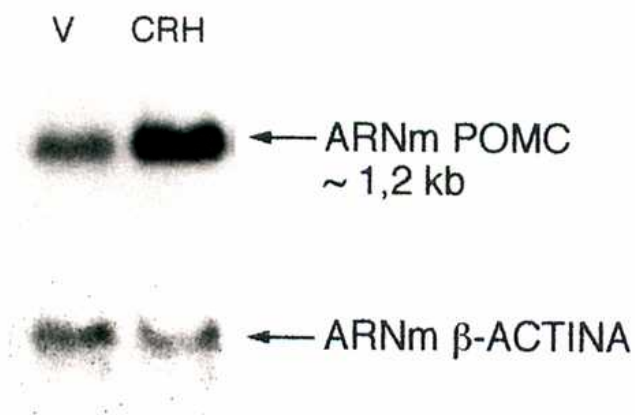
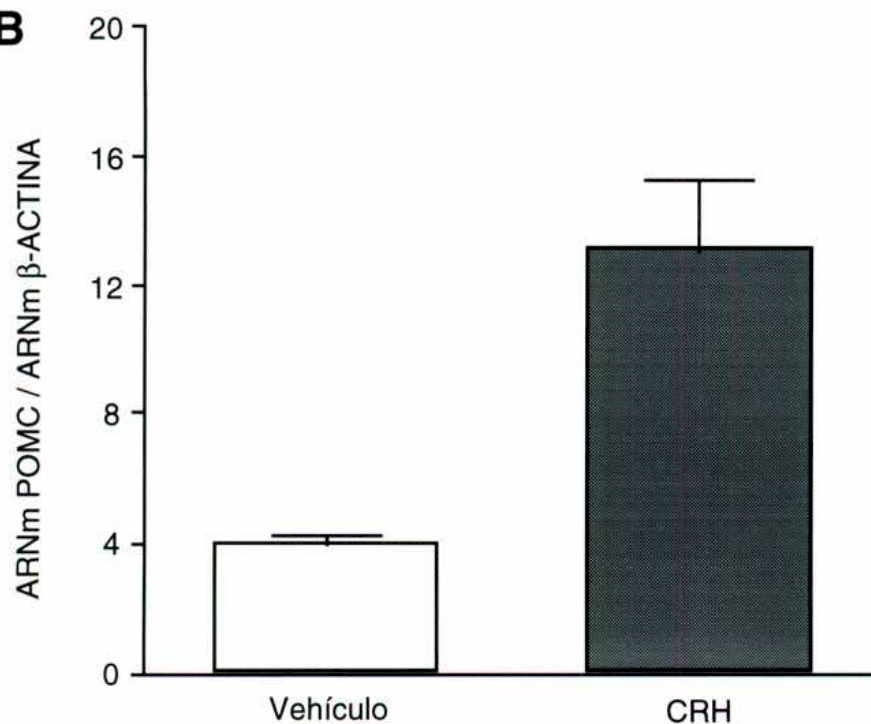
#### 4.2.1.1. Hormonas del eje HPA

La infusión crónica icv de CRH durante 7 días produce cambios significativos en la actividad del eje HPA. En el día 7 de tratamiento con la hormona, los niveles plasmáticos de ACTH y de corticosterona están significativamente elevados, 3,5 veces y 30 veces, respectivamente, comparado con los de los animales infundidos con el vehículo (tabla 4). Paralelamente, hubo un aumento en la expresión del ARNm del gen de POMC en la pituitaria anterior de las ratas tratadas icv con CRH comparada con la de los animales tratados con el vehículo (figura 9).

**Tabla 4.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH sobre los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona.

Tratamiento	ACTH (pg/ml)	corticosterona ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )
Vehículo	36,3 $\pm$ 4,7 (13)	0,3 $\pm$ 0,1 (13)
CRH 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hora}$	128,8 $\pm$ 15,0 * (11)	11,9 $\pm$ 1,2 * (11)

El número de animales en cada grupo experimental se indica entre paréntesis. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  ES. \*, P <0,05 (CRH vs. vehículo), test de la t de Student.

**A****B**

**Figura 9.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH o el vehículo (V) sobre la expresión del ARNm de POMC en la pituitaria anterior de la rata. A, análisis por Northern Blot del ARNm (20  $\mu$ g de ARN total/calle) de POMC y  $\beta$ -actina. Cada calle representa el análisis del ARN de un pool de pituitarias anteriores obtenidas de dos ratas. B, análisis semicuantitativo del contenido del ARNm de POMC. Los datos (promedio  $\pm$  ES, n=3) están expresados como la relación entre las señales obtenidas en las autorradiografías del ARNm de POMC y de  $\beta$ -actina.



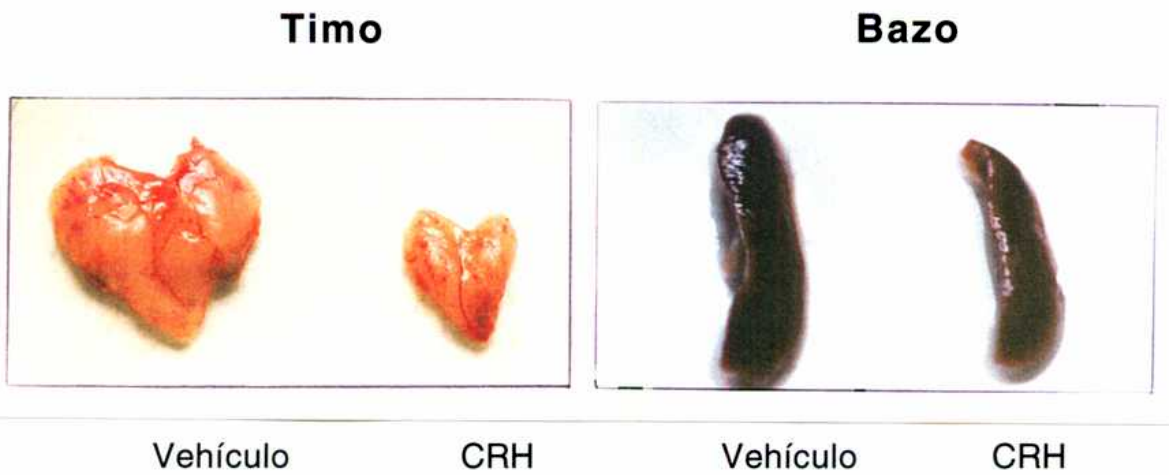
#### 4.2.1.2. Parámetros físicos

Durante el período de tratamiento, las ratas tratadas con CRH aumentan el 67% menos de peso corporal que las ratas tratadas con el vehículo, mientras que el peso de las glándulas adrenales estuvo incrementado en un 43% en las ratas infundidas con la CRH (tabla 5). Los pesos corporales finales de las ratas controles y de las ratas infundidas con CRH fueron: 122% ( $245 \pm 3$  g) y 107% ( $216 \pm 4$  g) respecto de sus pesos originales (100%), respectivamente. En los órganos inmunes, la infusión crónica icv de CRH produjo una reducción del 64% del peso del timo, como también una reducción del 43% del peso del bazo (tabla 5, figura 10). El número de células encontradas en el bazo de las ratas infundidas icv con la hormona, se reduce aproximadamente a la mitad de los que contiene el bazo de los animales tratados con el vehículo ( $48,5 \times 10^7$  vs.  $97,5 \times 10^7$  esplenocitos/bazo, respectivamente). Sin embargo, no se encuentran prácticamente diferencias si se comparan el número de esplenocitos respecto al peso del bazo ( $0,9 \times 10^6$  vs.  $1,1 \times 10^6$  esplenocitos/mg de bazo, respectivamente) en ambos grupos.

**Tabla 5.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH sobre parámetros físicos.

Parámetros	Vehículo		CRH (1 $\mu$ g/ $\mu$ l/hora)	
Aumento del peso corporal (g)	$45,3 \pm 0,2$	(19)	$15,1 \pm 1,7$ *	(17)
Peso de las glándulas adrenales (mg)	$31,3 \pm 0,6$	(16)	$44,9 \pm 1,2$ *	(15)
Peso del timo (mg)	$790 \pm 45$	(11)	$281 \pm 24$ *	(11)
Peso del bazo (mg)	$924 \pm 58$	(8)	$531 \pm 43$ *	(8)

El número de animales en cada grupo experimental se encuentra indicado entre paréntesis. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  ES. \*,  $P < 0,05$  (CRH vs. vehículo); test de la *t* Student.



**Figura 10.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH sobre el tamaño del bazo y del timo. En el momento del sacrificio se removieron el timo y el bazo para luego ser fotografiados.

#### 4.2.1.3. Proliferación de esplenocitos *in vitro*

Para investigar si la hiperactividad prolongada del eje HPA afecta la función inmune, se estudió, *in vitro*, la respuesta proliferativa de los linfocitos T y B. La proliferación de los esplenocitos incubados con el mitógeno de células T, Con A, provenientes de las ratas tratadas con CRH, está profundamente reducida comparativamente con la de los esplenocitos de las ratas infundidas con el vehículo (figura 11A). De forma similar, se encontró una supresión en la proliferación de los esplenocitos provenientes de los animales tratados con CRH, cuando las células fueron estimuladas con el mitógeno de células B, LPS; comparada con la proliferación observada en los animales infundidos con el vehículo (figura 11B).

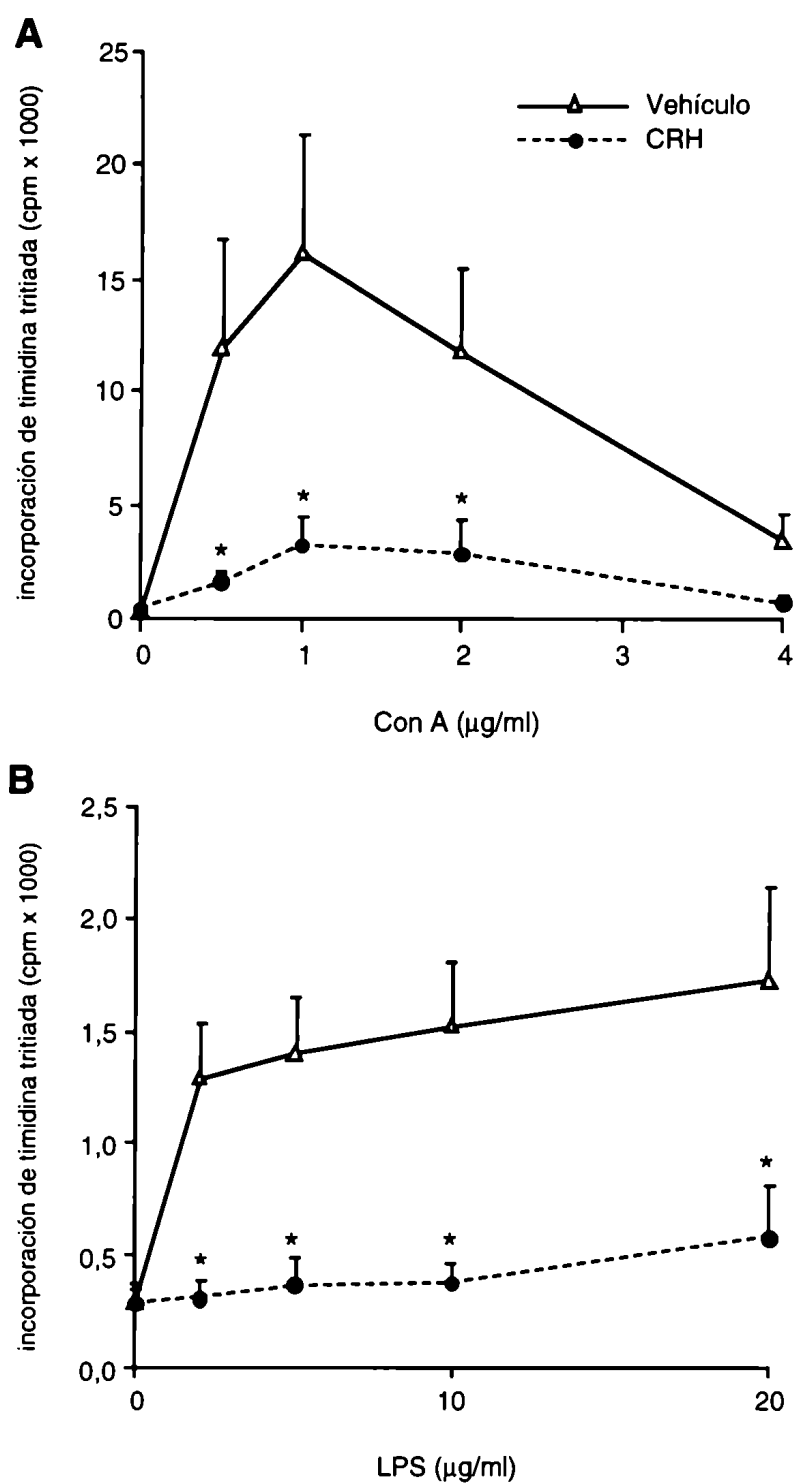
#### 4.2.1.4. Subpoblaciones de células T

El análisis de las subpoblaciones por inmunofluorescencia de células T presentes en el bazo no mostró diferencias significativas entre los porcentajes obtenidos para las ratas tratadas con el vehículo comparados con los de las que

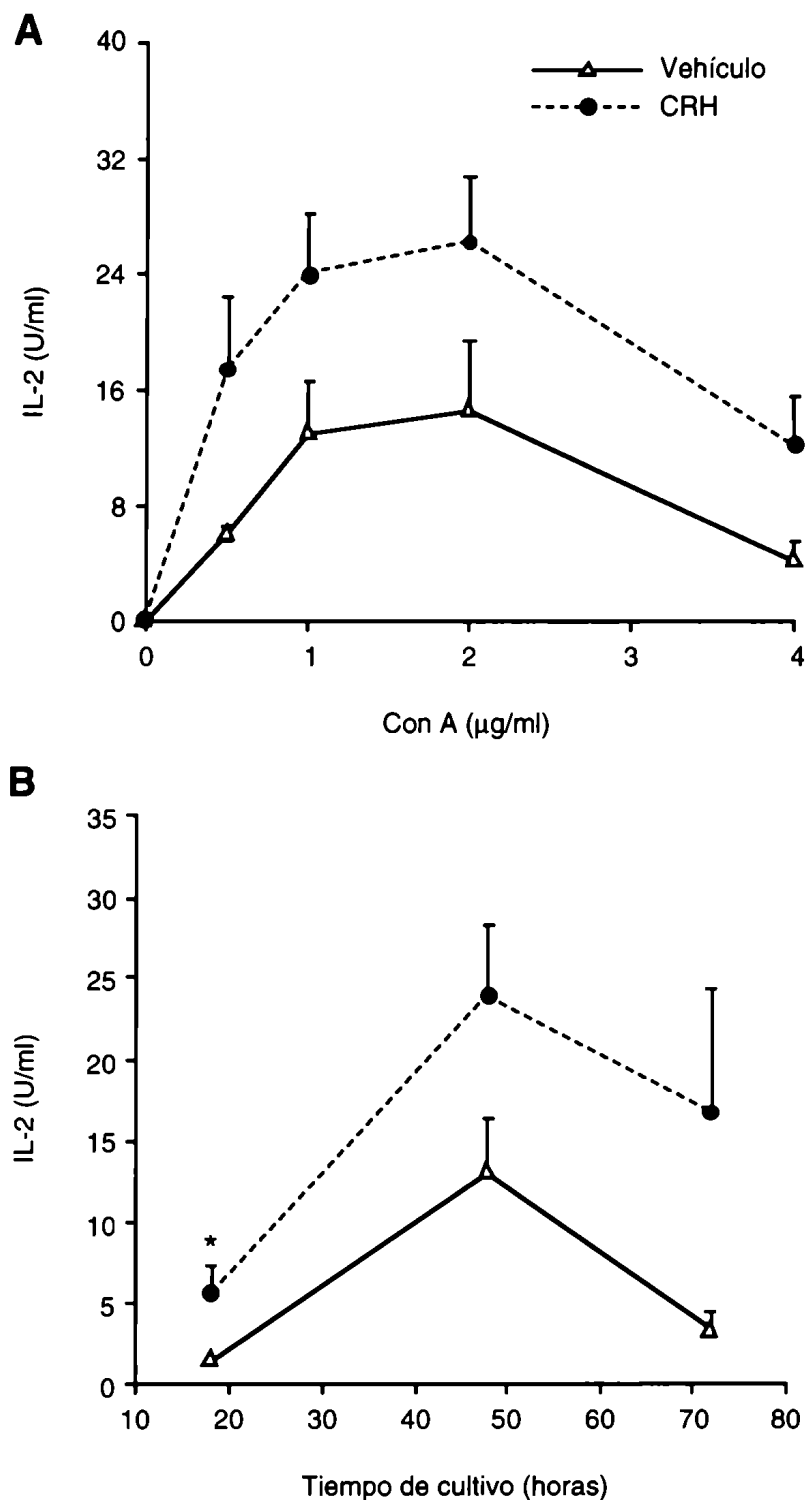
recibieron la infusión crónica de CRH. El porcentaje de las células T para las ratas tratadas con el vehículo fue del 30% mientras que los animales que recibieron la CRH presentan un porcentaje del 34%. Tampoco se observaron diferencias significativas en los porcentajes de las células Th CD4<sup>+</sup> entre el vehículo (15%) y la CRH (17%). Los porcentajes de las células T supresoras/células citotóxicas CD8<sup>+</sup> también se encontraron dentro del mismo orden, 18% para las ratas que recibieron el vehículo vs. 15% para aquellas infundidas con la hormona.

#### 4.2.1.5. *Producción de IL-2 y del IL-2R $\alpha$ in vitro*

El siguiente paso fue el estudio del rol del principal factor de crecimiento de las células T, la IL-2, en la reducción de la respuesta proliferativa de los esplenocitos al mitógeno Con A, observada en las ratas infundidas icv con CRH. Se midió la concentración de esta interleuquina en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos incubados por 18, 48 y 72 horas. La figura 12A muestra los efectos de varias concentraciones de Con A sobre los niveles de IL-2 luego de 48 horas de incubación de los esplenocitos provenientes de las ratas infundidas con CRH y de los animales que recibieron el vehículo. Se encontró que, para todas las concentraciones de Con A utilizadas, los niveles de IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos obtenidos de las ratas tratadas con CRH estuvieron marcadamente elevados comparados con aquellos encontrados en los animales infundidos con el vehículo (figura 12A). Pese a que las diferencias encontradas al comparar los datos de IL-2 de las ratas tratadas con la CRH vs. las tratadas con el vehículo para cada concentración de Con A por el test de Duncan no fueron significativas, sí lo fueron al analizar los efectos del tratamiento (CRH vs vehículo) mediante el análisis de varianza (ANOVA) con una  $P = 0,001$ . Entre las 18 y las 72 horas de cultivo celular, los niveles de IL-2 inducidos por Con A (1  $\mu\text{g/ml}$ ) fueron más altos en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos de las ratas infundidas con CRH comparado con los de los animales tratados con el vehículo (figura 12B).

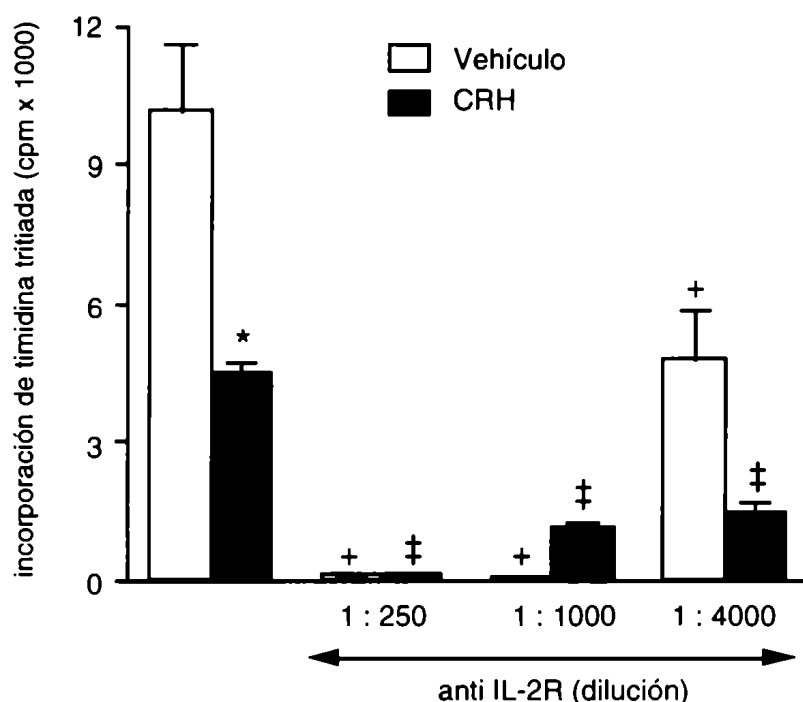


**Figura 11.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH en ratas, sobre la proliferación de esplenocitos. Los datos se presentan como curvas dosis-respuesta de Con A (A) y de LPS (B). La proliferación de los esplenocitos se encuentra expresada como la incorporación de timidina tritiada en cpm (promedio  $\pm$  ES,  $n = 8$ ). ANOVA: A, efecto de la concentración de Con A:  $F(4, 70) = 4,220$ ,  $P = 0,004$ ; efecto del tratamiento (CRH vs vehículo):  $F(1, 70) = 17,023$ ,  $P \leq 0,0005$ . B, efecto de la concentración de LPS:  $F(4, 70) = 3,499$ ,  $P = 0,012$ ; efecto del tratamiento (CRH vs. vehículo):  $F(1, 70) = 37,901$ ,  $P \leq 0,0005$ . \*,  $P < 0,05$  (CRH vs. vehículo), test de Duncan de rango múltiple.



**Figura 12.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH sobre la producción de IL-2 por esplenocitos estimulados con Con A. A, estimulación, *in vitro*, por 48 horas con varias concentraciones de Con A. B, estimulación *in vitro* con Con A (1 µg/ml) por 18, 48 y 72 horas. Los datos están expresados como U/ml (promedio ± ES (n=4)). ANOVA: A, efecto de la concentración de Con A:  $F(4, 30) = 11,441$ ,  $P \leq 0.0005$ ; efecto del tratamiento (CRH vs vehículo):  $F(1, 30) = 14,833$ ,  $P = 0,001$ . B, efecto del tiempo de cultivo:  $F(2, 18) = 7,389$ ,  $P = 0,005$ ; efecto del tratamiento (CRH vs. vehículo):  $F(1, 18) = 8,869$ ,  $P = 0.008$ .\*,  $P < 0,05$  (CRH vs. vehículo), testde Duncan de rango múltiple.

Para verificar si la proliferación de células T de las ratas tratadas icv con CRH *in vivo*, depende de la vía de la IL-2, se agregaron diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-2R $\alpha$  de rata en la presencia de Con A (1 $\mu$ g/ml) a los cultivos celulares. Dicho anticuerpo se une a la cadena  $\alpha$  y bloquea subsecuentemente la unión de la IL-2 a su receptor. Aunque la IL-2 es el factor de crecimiento más importante de las células T (Smith, 1988), otras interleuquinas, como la IL-1, la IL-4 y la IL-6 co-promueven la proliferación de los linfocitos T (Harrison & Campbell, 1988). La mitogénesis inducida por Con A en los esplenocitos de tanto las ratas controles como las tratadas con CRH fue completamente bloqueada por el anticuerpo (figura 13). Este resultado sugiere que la IL-2 es el factor principal de crecimiento para ambos linfocitos, los provenientes de las ratas tratadas con el vehículo o con la CRH.

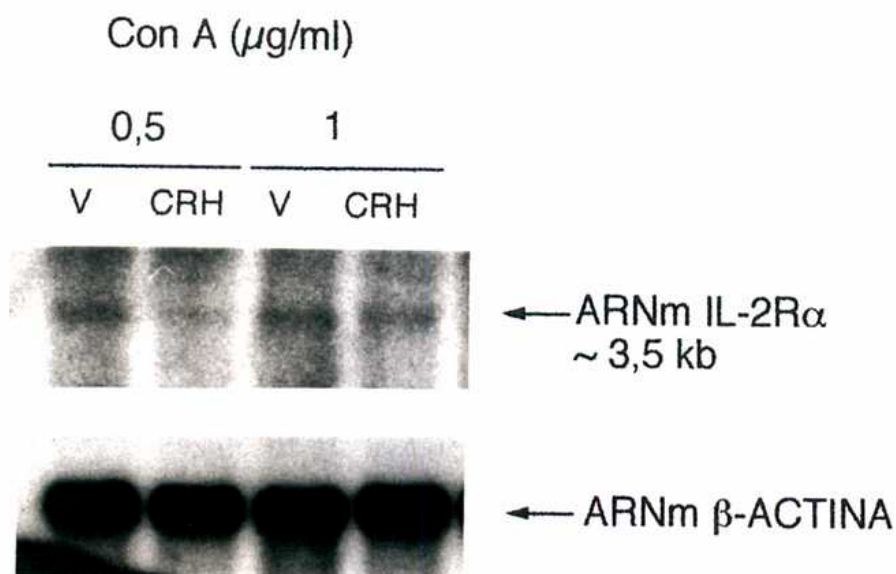
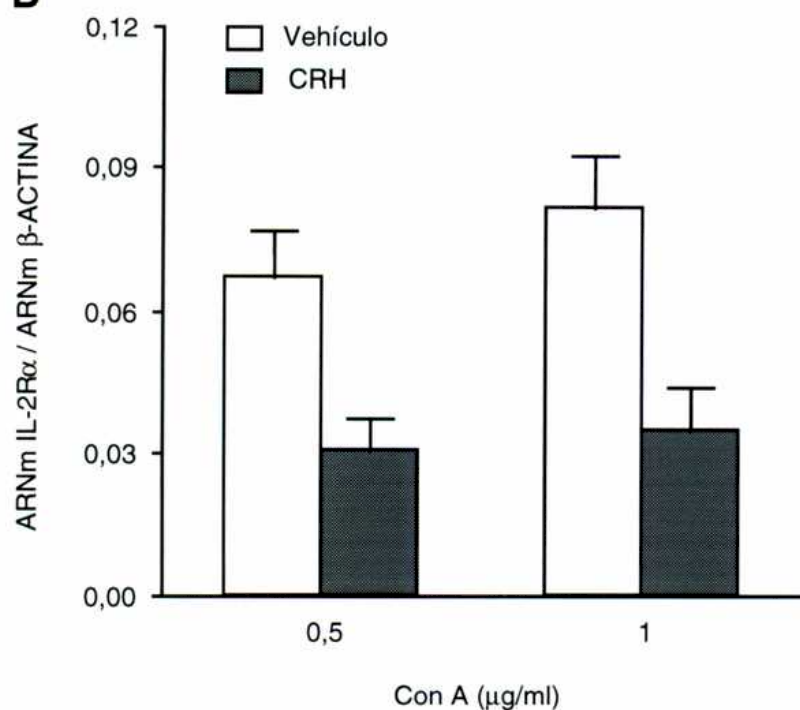


**Figura 13.** Efecto del anti-IL-2R $\alpha$  sobre la proliferación de los esplenocitos estimulados con Con A (1  $\mu$ g/ml) provenientes de las ratas tratadas con el vehículo o con CRH. Las células fueron tratadas con el mitógeno y con diferentes diluciones del anticuerpo anti-IL-2R $\alpha$ . La proliferación linfocitaria está expresada como la incorporación de timidina tritiada en cpm, la incorporación sin Con A fue de  $350 \pm 50$  cpm (promedio  $\pm$  ES,  $n = 3$ ). ANOVA: efecto de la dilución del anticuerpo:  $F(3, 21) = 36,725$ ,  $P = 0,0005$ ; efecto del tratamiento:  $F(1, 21) = 19,748$ ,  $P = 0,0005$ . \*,  $P \leq 0,05$  (CRH vs.vehículo); +,  $P \leq 0,05$  (vehículo con el anticuerpo vs. vehículo sin el anticuerpo); ‡,  $P \leq 0,05$  (CRH con el anticuerpo vs.CRH sin el anticuerpo); test de Duncan de rango múltiple.

---

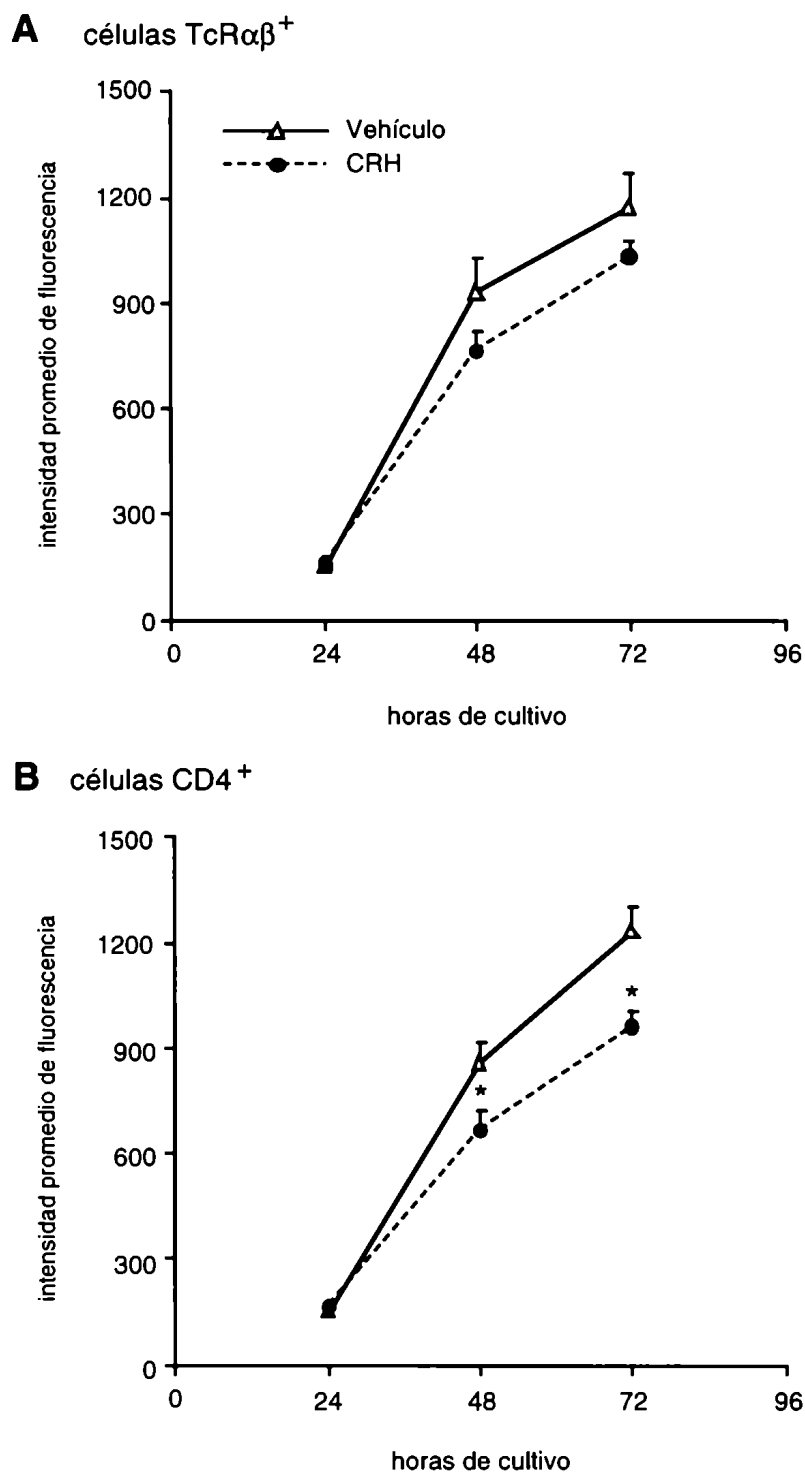
Ya que la inducción de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 constituye un paso crítico en el crecimiento de células T estimuladas por mitógenos, se estudió el efecto del tratamiento icv con CRH sobre la expresión del IL-2R $\alpha$ , a nivel del ARNm y a nivel proteico. La figura 14 muestra que 24 horas luego de la estimulación *in vitro* con el mitógeno Con A, los esplenocitos expresan el ARNm del IL-2R $\alpha$ , el cual se observa en el blot (figura 14A ) como una banda única cuya longitud es aproximadamente de 3,5 kb. El tratamiento icv de los animales con CRH *in vivo* resultó en una inhibición marcada de la expresión del IL-2R $\alpha$  inducida por Con A (figura 14).

Por otro lado se analizó, mediante el uso de la técnica de doble-inmunofluorescencia, los niveles de expresión de la proteína IL-2R $\alpha$  en la superficie celular de esplenocitos TcR $\alpha\beta^+$  y CD4 $^+$  incubados por 24, 48 y 72 horas en la presencia de Con A, provenientes de ratas tratadas icv con el vehículo o con la CRH. El análisis mostró una disminución en la expresión del IL-2R $\alpha$  en los linfocitos de las ratas infundidas icv con CRH en comparación con los niveles obtenidos para las ratas tratadas con el vehículo, luego de 48 y 72 horas de estimulación de los esplenocitos con Con A *in vitro* (figura 15).

**A****B**

**Figura 14.** Efecto de la infusión crónica icv con CRH o el vehículo (V) sobre la expresión del ARNm del IL-2R $\alpha$  inducido por 0,5 y 1  $\mu\text{g/ml}$  de Con A durante 24 horas en esplenocitos. A, análisis por Northern blot del ARNm del IL-2R $\alpha$  y de  $\beta$ -actina (20  $\mu\text{g}$  de ARN total /calle). B, análisis semicuantitativo del contenido de ARNm de IL-2R $\alpha$  en esplenocitos estimulados. Los datos (promedio  $\pm$  ES, n = 3) se encuentran expresados como la relación entre las señales obtenidas en las autorradiografías del ARNm del IL-2R $\alpha$  y de  $\beta$ -actina.



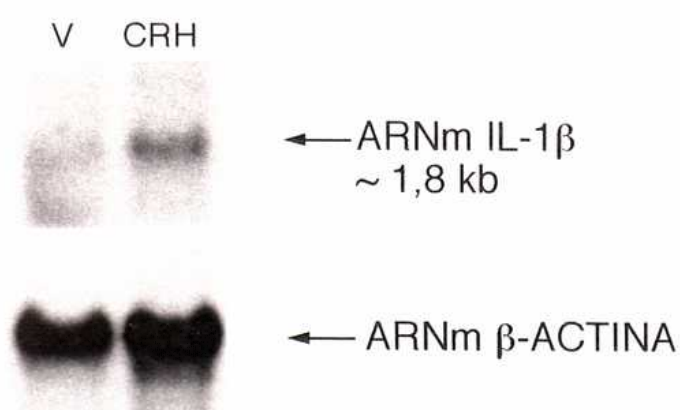
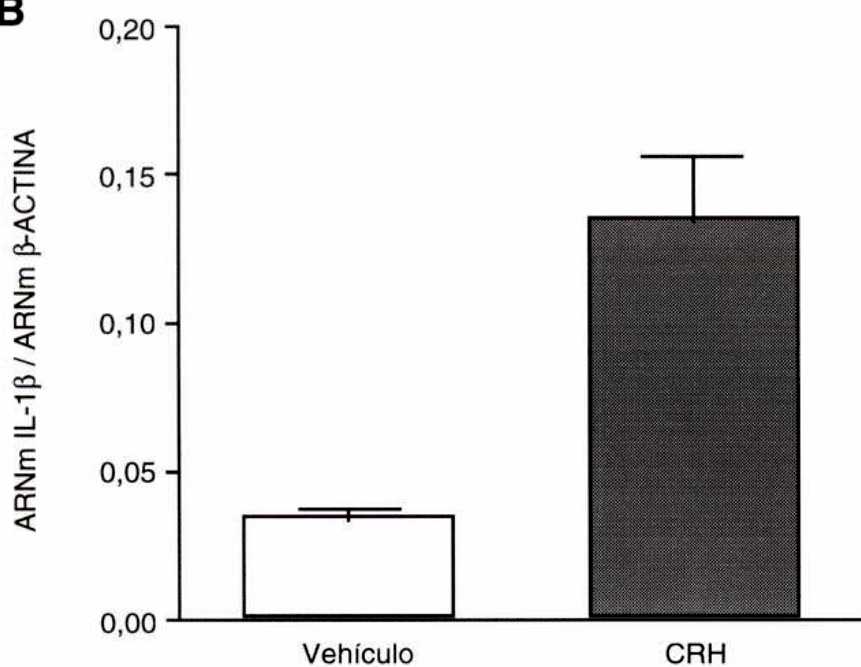


**Figura 15.** Efecto del tratamiento crónico icv con CRH sobre la expresión proteica del IL-2R $\alpha$  inducido por 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Con A en la superficie celular de esplenocitos. Luego de 24, 48 y 72 horas de cultivo, las células fueron analizadas por doble-inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-IL-2R $\alpha$  conjugado con ficoeritrina y con los anticuerpos anti-TcR $\alpha\beta$  (A) o anti-CD4 (B), conjugados ambos con FITC. Anticuerpos no relacionados IgG1 conjugados con PE o con FITC fueron usados como controles. Los resultados se encuentran expresados como la intensidad promedio de fluorescencia ( $n = 3$ ). ANOVA: A, efecto del tiempo:  $F(2,12) = 116,234$ ,  $P = 0,0005$ ; efecto del tratamiento:  $F(1,12) = 3,386$ ,  $P = 0,091$ . B, efecto del tiempo:  $F(2,12) = 175,472$ ,  $P = 0,0005$ ; efecto del tratamiento:  $F(1,12) = 12,725$ ,  $P = 0,004$ . \*,  $P < 0,05$  (CRH vs. vehículo), test de Duncan de rango múltiple.

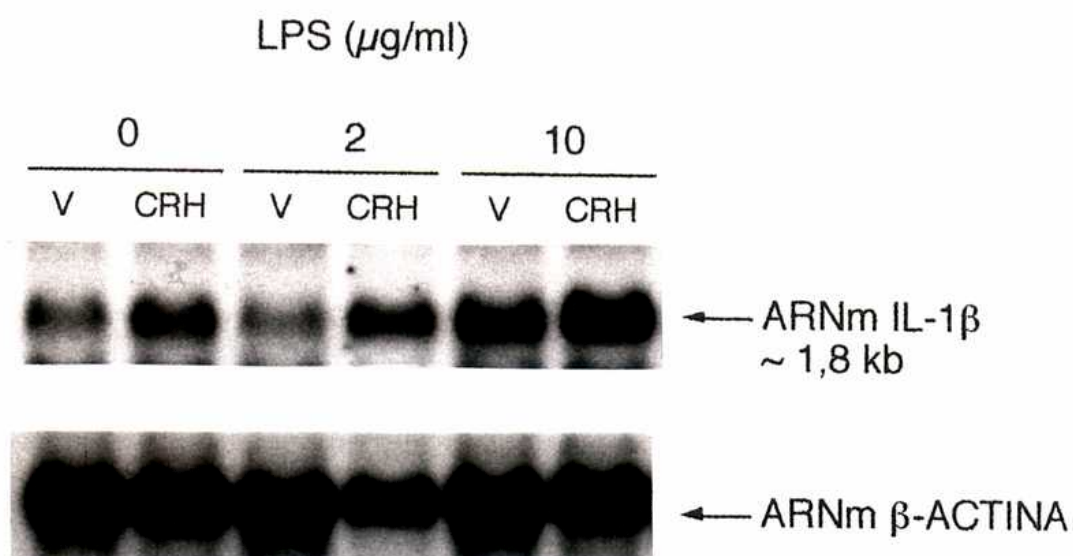
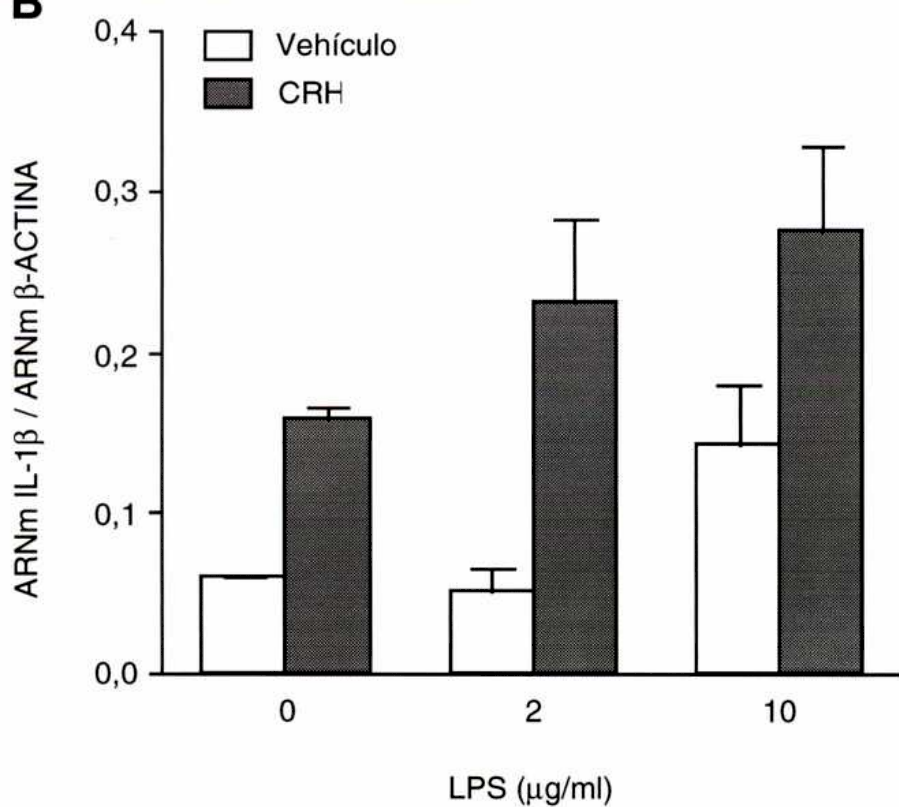
#### 4.2.1.6. Expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ en esplenocitos y macrófagos

Se estudió también, si la regulación de la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$  en esplenocitos, estaba alterada por el tratamiento crónico con CRH icv. El ARNm de IL-1 $\beta$  fue observado en el Northern blot mediante una autoradiografía como una única banda de aproximadamente 1,8 kb (figura 16A, 17A, 18A). La figura 16A muestra la expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  en esplenocitos aislados del bazo inmediatamente luego de ser extraído del cuerpo de la rata, es decir, sin ser cultivado previamente. En el día 7 de la infusión crónica icv con CRH, la expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  en dichas células estuvo marcadamente elevada (figura 16). Del mismo modo, cuando los esplenocitos fueron estimulados *in vitro* con LPS y cultivados por 16 horas, la expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  estuvo aumentada en los esplenocitos de los animales tratados con CRH (figura 17).

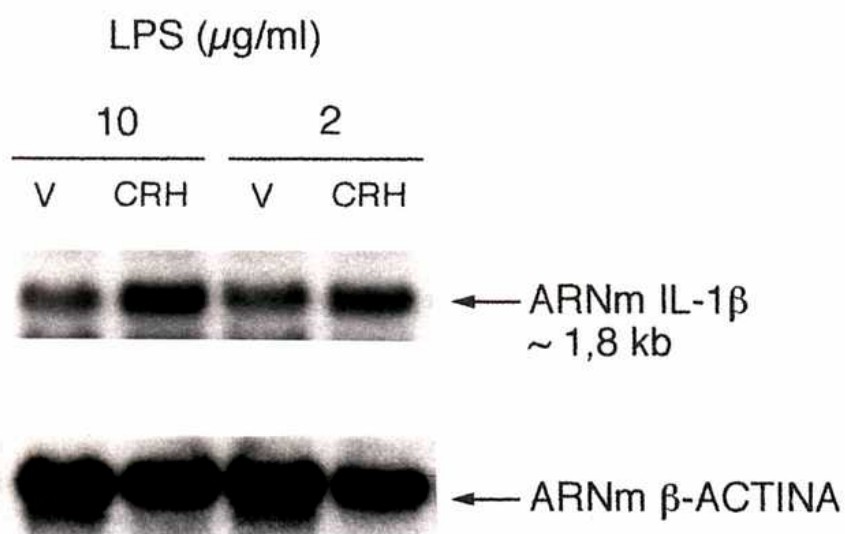
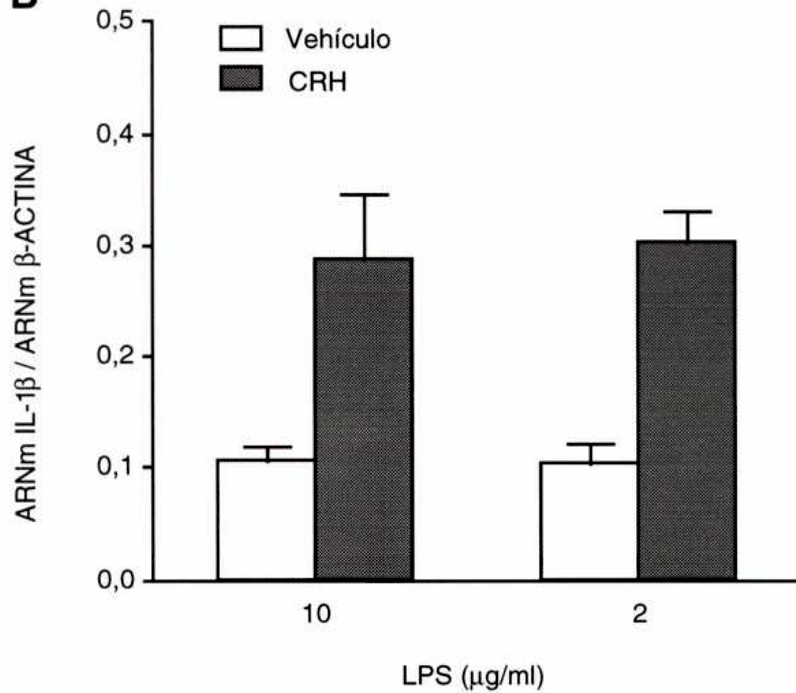
Como en este sistema de cultivo celular, los macrófagos son la principal fuente de expresión de IL-1 $\beta$ , se aislaron estas células de los esplenocitos totales y se cultivaron, *in vitro*, por 16 horas. La estimulación de la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$  inducida por el mitógeno LPS, produjo un mayor aumento en la de los macrófagos de las ratas tratadas icv con CRH, comparado con la de los animales infundidos con el vehículo (figura 18).

**A****B**

**Figura 16.** Expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  en esplenocitos no cultivados de ratas tratadas icv con CRH o el vehículo (V). A, análisis por Northern Blot del ARNm (20  $\mu$ g de ARN total/calle) de la IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina. B, análisis semicuantitativo del contenido del ARNm de IL-1 $\beta$  de esplenocitos. Los datos (promedio  $\pm$  ES, n=3) están expresados como la relación entre las señales obtenidas en las autorradiografías del ARNm de IL-1 $\beta$  y de  $\beta$ -actina.

**A****B**

**Figura 17.** Efecto del tratamiento crónico icv con CRH o el vehículo (V) sobre la expresión, inducida por LPS *in vitro*, del ARNm de la IL-1 $\beta$  en esplenocitos. Los esplenocitos fueron estimuladas con 0,2 ó 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS durante 16 horas. A, análisis por Northern Blot del ARNm (20  $\mu\text{g}$  de ARN total/calle) de IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina. B, análisis semicuantitativo del contenido del ARNm de IL-1 $\beta$  de esplenocitos. Los datos (promedio  $\pm$  ES, n=3) están expresados como la relación entre las señales obtenidas en las autorradiografías del ARNm de IL-1 $\beta$  y de  $\beta$ -actina.

**A****B**

**Figura 18.** Efecto del tratamiento *in vitro* con CRH o el vehículo (V) sobre la expresión, inducida por LPS *in vitro*, del ARNm de la IL-1 $\beta$  en macrófagos. Los macrófagos fueron estimulados *in vitro* con 2 ó 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS durante 16 horas. A, análisis por Northern Blot del ARNm (20  $\mu\text{g}$  de ARN total/calle) de IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina. B, análisis semicuantitativo del contenido del ARNm de IL-1 $\beta$  de macrófagos. Los datos (promedio  $\pm$  ES, n=3) están expresados como la relación entre las señales obtenidas en las autorradiografías del ARNm de IL-1 $\beta$  y de  $\beta$ -actina.

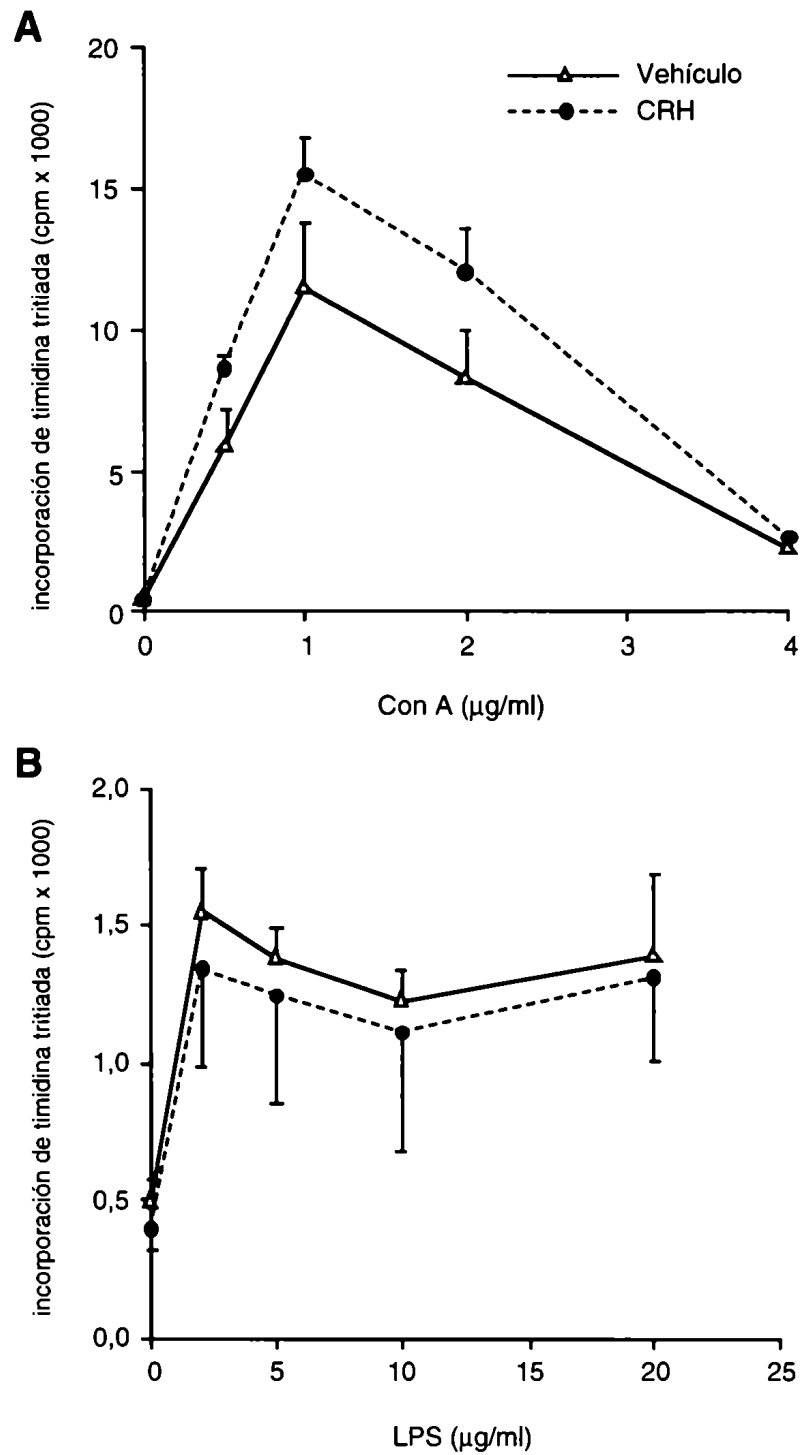
#### **4.2.2. Ratas adrenalectomizadas por 7 días**

##### *4.2.2.1. Proliferación de esplenocitos in vitro*

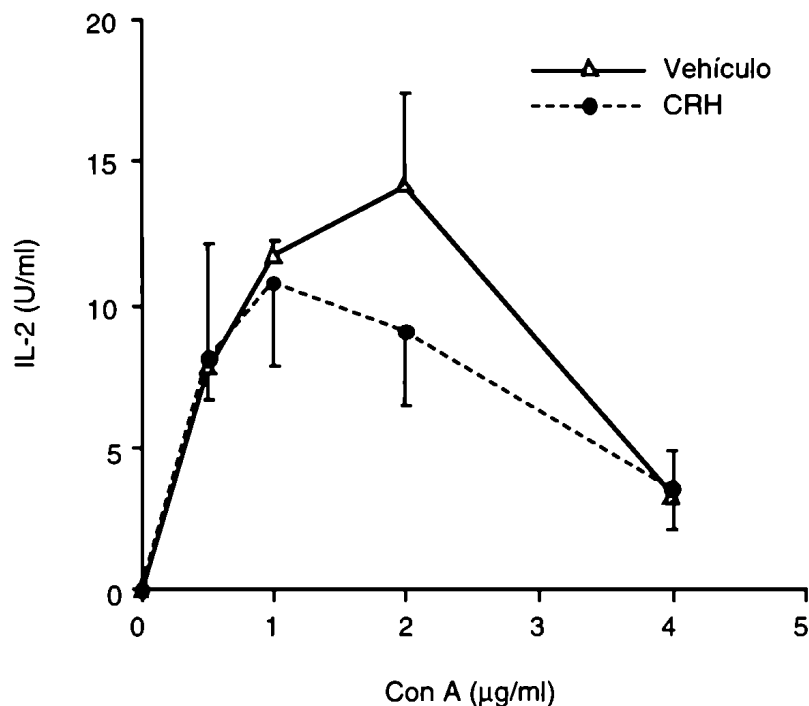
Con el fin de investigar si los productos de la glándula adrenal participan en el efecto del tratamiento crónico icv con la hormona CRH sobre la proliferación de los esplenocitos, las ratas fueron adrenalectomizadas al mismo tiempo de empezar con la infusión crónica icv del vehículo o de la CRH. La adrenalectomía erradicó completamente el efecto supresor de la administración crónica icv de CRH sobre la mitogénesis de los esplenocitos inducida tanto por Con A como por LPS (figura 19).

##### *4.2.2.2. Producción de la IL-2 in vitro*

Luego de observar que la adrenalectomía previno completamente el efecto supresivo del tratamiento icv con CRH sobre la proliferación de los esplenocitos inducida por Con A, se investigó el efecto de la adrenalectomía sobre la producción de IL-2 por los esplenocitos. Los niveles de IL-2 fueron determinados en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos estimulados por Con A durante 18, 48 ó 72 horas. Los esplenocitos cultivados por 48 horas obtenidos de las ratas adrenalectomizadas infundidas con CRH, produjeron cantidades comparables de IL-2 respecto de las producidas por las ratas adrenalectomizadas tratadas con el vehículos (figura 20). Resultados similares fueron observados luego de que las células fueron cultivadas por 18 ó 72 horas en la presencia de Con A (datos no mostrados).



**Figura 19.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH en ratas adrenalectomizadas al tiempo de comenzar con la infusión, sobre la proliferación de esplenocitos *in vitro*. Los datos se presentan como curvas dosis-respuesta de Con A (A) y de LPS (B). Los datos de proliferación están expresados como la incorporación de timidina tritiada en cpm (promedio  $\pm$  ES, n = 6). ANOVA: A, efecto de la concentración de Con A:  $F(4, 50) = 27,373$ ,  $P \leq 0,0005$ ; efecto del tratamiento (CRH vs vehículo):  $F(1, 50) = 3,707$ ,  $P = 0,06$ . B, efecto de la concentración de LPS:  $F(4, 50) = 4,574$ ,  $P = 0,003$ ; efecto del tratamiento (CRH vs. vehículo):  $F(1, 50) = 0,608$ ,  $P \leq 0,439$ .

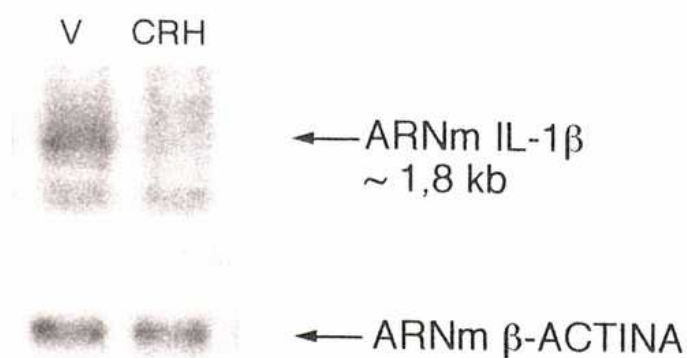
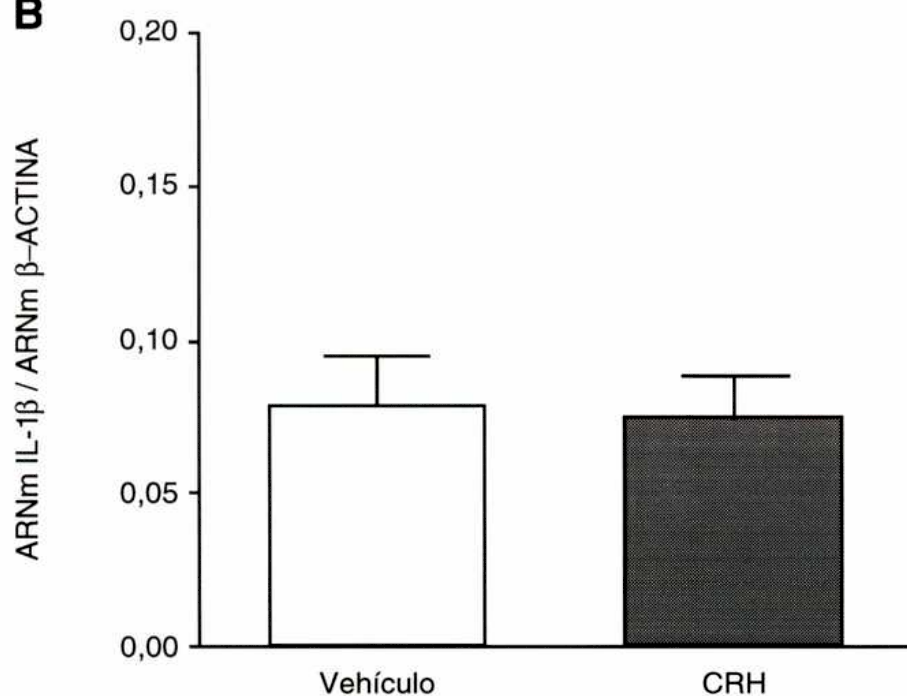


**Figura 20.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH en ratas adrenalectomizadas sobre la producción de IL-2 por esplenocitos. Las células fueron inducidas por Con A , *in vitro*, durante 48 horas. Los datos se presentan como U/ml (promedio  $\pm$  ES, n = 3). ANOVA: A, efecto de la concentración de Con A:  $F(4, 20) = 10,710$ ,  $P \leq 0,0005$ ; efecto del tratamiento (CRH vs. vehículo):  $F(1, 20) = 0,643$ ,  $P < 0,432$ .

#### 4.2.2.3. Expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ en esplenocitos

Se investigó si la adrenalectomía llevada a cabo al mismo tiempo en que fue comenzada la infusión crónica icv de CRH, cambia el aumento en la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$  observada en los esplenocitos de las ratas no adrenalectomizadas infundidas por CRH. Se encontraron niveles similares de expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  en los esplenocitos obtenidos directamente del bazo tanto de los animales adrenalectomizados tratados con el vehículo como en los tratados con CRH (figura 21). Así, la adrenalectomía realizada al mismo tiempo en que comienza la infusión crónica icv de la CRH o del vehículo, revierte el efecto del tratamiento icv con CRH sobre la expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  en los esplenocitos (figura 21). Del mismo modo no se encontraron diferencias significativas en la expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  entre los esplenocitos obtenidos de los animales adrenalectomizados tratado con el vehículo o con la CRH luego de la estimulación de las células, *in vitro*, con LPS (2 o 10  $\mu$ g/ml) por 16 horas (datos no mostrados).



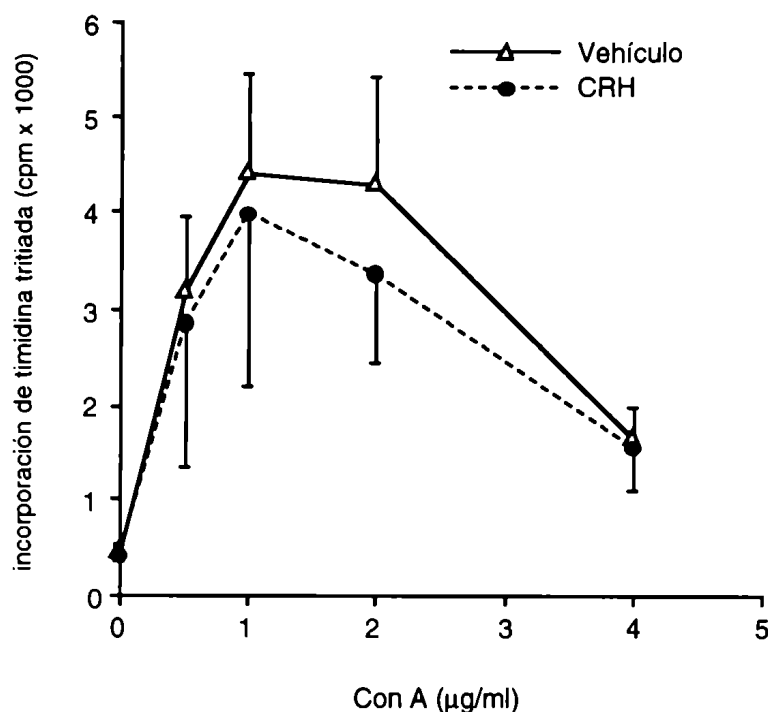
**A****B**

**Figura 21.** Expresión del ARNm de IL-1 $\beta$  en esplenocitos no cultivados obtenidos de ratas adrenalectomizadas e infundidas crónicamente icv con CRH o con el vehículo (V). La adrenalectomía se realizó al mismo tiempo en el que comenzó la infusión icv durante 7 días. A, análisis por Northern blot del ARNm de IL-1 $\beta$  y de  $\beta$ -actina (20  $\mu$ g de ARN total/calle). B, análisis semicuantitativo del ARNm de IL-1 $\beta$ . Los datos (promedio  $\pm$  ES, n = 3) se encuentran expresados como la relación entre las señales presentes en las autorradiografías del ARNm de IL-1 $\beta$  y de  $\beta$ -actina.

### 4.2.3. Ratas adrenalectomizadas por 1 día

#### 4.2.3.1. Proliferación de esplenocitos *in vitro*

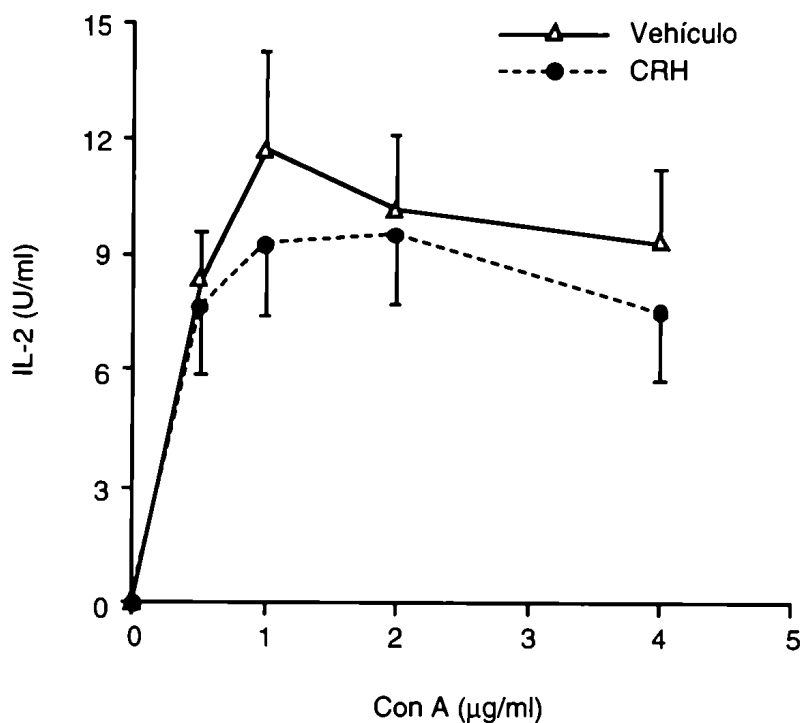
La ausencia de las glándulas adrenales durante los 7 días que dura la infusión de CRH previno los efectos supresivos inducidos por la CRH en cuanto a la proliferación linfocitaria. Se estudió si la adrenalectomía realizada 1 día antes de terminado el período de infusión también modificaba la supresión de la proliferación ejercida por la infusión de CRH. Con dicha finalidad, se adrenalectomizaron ratas infundidas icv con la CRH o con el vehículo, en el día 6 del período de infusión. Se midió la proliferación de las células T inducida por Con A, *in vitro*. Las ratas adrenalectomizadas en el día 6 del período de infusión muestran niveles proliferativos similares tanto en los animales tratados con la CRH como en los tratados con el vehículo (figura 22). La ausencia de corticosterona por 1 día produce el mismo efecto en la respuesta proliferativa de esplenocitos que la adrenalectomía realizada al comienzo de la infusión.



**Figura 22.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH en ratas adrenalectomizadas por 1 día, sobre la proliferación de esplenocitos. Los datos se presentan como curvas dosis-respuesta de Con A. La proliferación de los esplenocitos está expresada como la incorporación de timidina tritiada en cpm (promedio  $\pm$  ES,  $n = 12$  a  $13$ ). ANOVA: efecto de la concentración de Con A:  $F(4, 115) = 5,278$ ,  $P = 0,001$ ; efecto del tratamiento (CRH vs. vehículo):  $F(1,115) = 0,363$ ,  $P = 0,548$ .

#### 4.2.3.2. Producción de IL-2 *In vitro*

Se investigó entonces los efectos de la adrenalectomía por 1 día en ratas infundidas icv con CRH o con el vehículo, en la producción de la IL-2 por esplenocitos estimulados *in vitro* por Con A. En ratas adrenalectomizadas por 1 día, los niveles de IL-2 presentes en los sobrenadantes de esplenocitos estimulados por 18, 48 ó 72 horas provenientes de ratas tratadas con CRH son similares a los de las tratadas con el vehículo. En la figura 23 se muestran los valores provenientes de los sobrenadantes de esplenocitos estimulados por 48 horas. A las 18 y 72 horas de estímulo se obtuvieron datos similares (datos no mostrados).



**Figura 23.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH sobre la producción de IL-2 inducida por Con A, en ratas adrenalectomizadas por 1 día. Los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron colectados a las 48 horas. Los datos están expresados como U/ml (promedio  $\pm$  ES,  $n = 11$  a  $12$ ). ANOVA: efecto de la concentración de Con A:  $F(4, 106) = 12,810$ ,  $P < 0,0005$ ; efecto del tratamiento (CRH vs. vehículo):  $F(1, 106) = 0,506$ ,  $P < 0,478$ .

### **4.3. Efectos de la infusión crónica icv de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ /hora de CRH en ratas sacrificadas después del período de infusión**

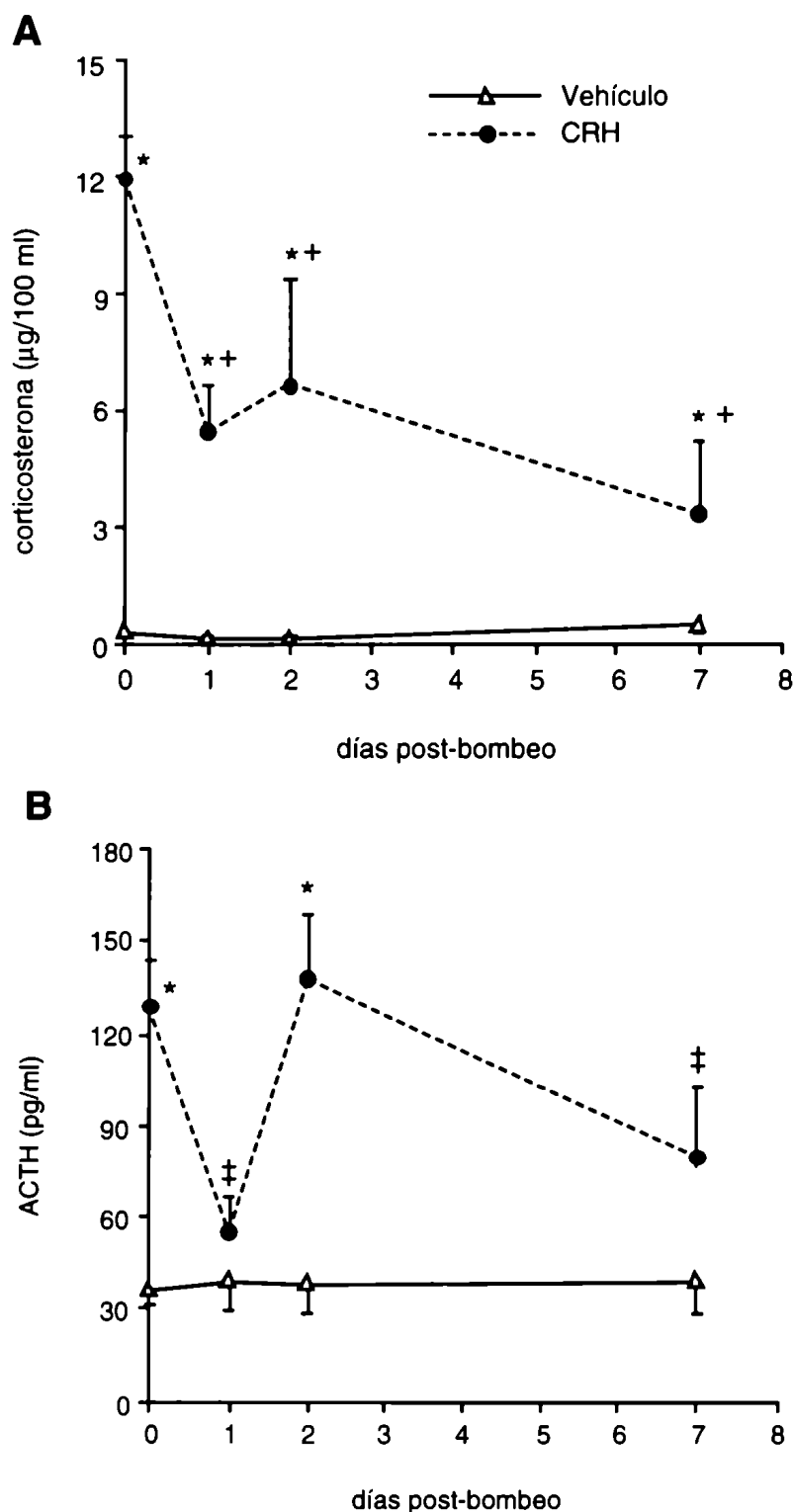
#### **4.3.1. Hormonas del eje HPA**

Se investigó el estado funcional del eje HPA después de terminado el período de infusión crónica icv de CRH. Se midieron los niveles de ACTH y corticosterona plasmáticos en los días 1, 2 y 7 después de los 7 días de infusión icv de CRH o del vehículo. En las ratas tratadas icv con CRH, se encontró una disminución substancial en los niveles de corticosterona plasmáticos el día 1 después de terminado el período de infusión. Aunque dichos niveles de corticosterona siguen estando elevados si se los compara con los detectados en las ratas que recibieron la infusión crónica icv con el vehículo (figura 23A). Del mismo modo, en las ratas tratadas icv con CRH, el día 1 después de terminado el período de infusión, los niveles plasmáticos de ACTH disminuyeron significativamente. No se encontraron diferencias significativas al comparar dichos valores de ACTH respecto a los valores obtenidos en las ratas tratadas icv con el vehículo 1 día post-bombeo (figura 23B).

En las ratas tratadas icv con CRH, en el segundo día después de terminado el período de infusión, se encontraron niveles plasmáticos de corticosterona similares a los encontrados el primer día después de terminado el período de infusión. Sorprendentemente, los niveles de ACTH estuvieron nuevamente elevados en el segundo día post bombeo, respecto al primer día post-bombeo (figura 23).

Siete días después de terminado el período de infusión con la hormona CRH los niveles plasmáticos de corticosterona fueron del orden de los detectados en el día 1 y 2 de la infusión crónica icv de CRH. Los niveles de corticosterona en plasma, siguen estando elevados respecto de las ratas tratadas con el vehículo (figura 23A).

En cambio, en las ratas infundidas crónicamente con CRH, los niveles de ACTH plasmáticos bajan en el día 7 post-bombeo respecto del día 2 con valores comparativos a los de los vehículos (figura 23B).



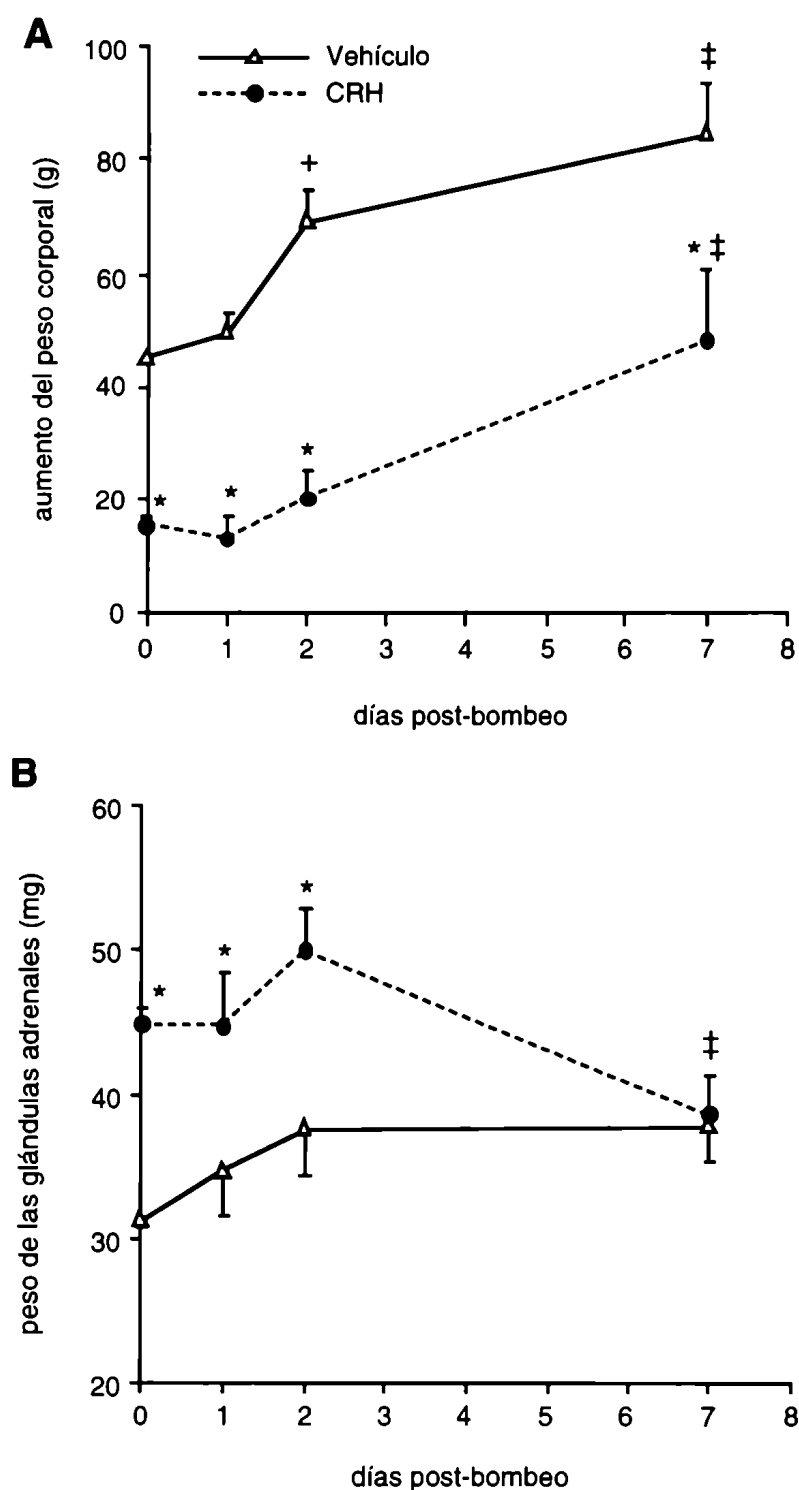
**Figura 23.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH sobre los niveles plasmáticos de corticosterona (A) y ACTH (B) en los días 0,1, 2 y 7 después del período de infusión. El día 0 post-bombeo corresponde al día 7 del período de infusión (tabla 4). Los datos están expresados como promedio  $\pm$  ES ( $n = 4$  a 8 para los días 1,2 y 7 post-bombeo). ANOVA: A, efecto del tiempo :  $F(3, 56) = 6,780, P < 0,001$ , efecto del tratamiento (CRH vs. vehículo):  $F(1, 56) = 104,279, P < 0,0005$ ; B, efecto del tiempo :  $F(3, 49) = 3,271, P < 0,029$ , efecto del tratamiento (CRH vs. vehículo):  $F(1, 49) = 52,588, P < 0,0005$ . \*,  $P < 0,05$  (CRH vs. vehículo); +,  $P < 0,05$  (CRH días 1, 2, 7 post-bombeo vs CRH día 0); ‡,  $P < 0,05$  (CRH día 1, 7 post-bombeo vs. CRH 0, 2 días post-bombeo); test de Duncan de rango múltiple.

#### 4.3.2. Parámetros físicos

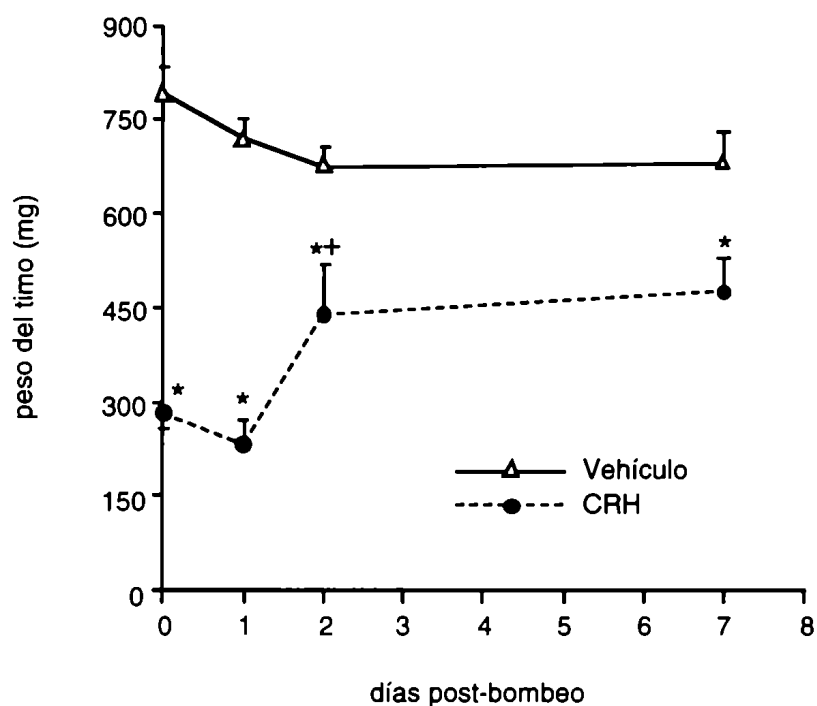
Durante el período de infusión icv, las ratas tratadas con CRH aumentan menos de peso corporal que las ratas tratadas con el vehículo, mientras que el peso de las glándulas adrenales estuvo incrementado en un 43% en las ratas infundidas con la CRH (tabla 5). En los días 1, 2 y 7 post-bombeo, los animales infundidos con CRH siguen pesando significativamente menos que los animales infundidos con el vehículo. Mientras que para los animales tratados con el vehículo se produce un aumento significativo en el peso corporal en el día 2 y 7 post-bombeo comparado con el del día 1 y 2 post-bombeo, respectivamente; en los infundidos con CRH, esta diferencia significativa se produce recién en el día 7 post-bombeo respecto al día 2 (figura 24A).

En el día 7 después del período de infusión el peso de las glándulas adrenales es semejante en las ratas tratadas con CRH y con el vehículo. Desde el día 2 al 7 post-bombeo se produce una disminución significativa del peso de las adrenales en los animales tratados con la CRH (figura 24 B).

La reducción del peso del timo en los animales infundidos con la hormona, se observa tanto durante la infusión como después de la misma respecto de los animales tratados con el vehículo. Sin embargo se observa un incremento significativo del peso del timo en los animales infundidos con CRH en el día 2 comparado con los del día 1 post-bombeo (figura 25).



**Figura 24.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH sobre el aumento del peso corporal (A) y el peso de las glándulas adrenales (B) en los días 0, 1, 2 y 7 después de finalizado el período de infusión. El día 0 post-bombeo corresponde al día 7 del período de infusión (tabla 5). Los datos están expresados como el promedio  $\pm$  ES ( $n = 4$  a  $9$  para los días 1,2 y 7 post-bombeo). ANOVA: A, efecto del tiempo:  $F(3, 58) = 30,889$ ,  $P < 0,0005$ , efecto del tratamiento (CRH vs vehículo):  $F(1, 58) = 174,769$ ,  $P < 0,0005$ ; B, efecto del tiempo:  $F(3, 60) = 1,654$ ,  $P < 0,186$ , efecto del tratamiento (CRH vs vehículo):  $F(1, 60) = 41,140$ ,  $P < 0,0005$ . \*,  $P < 0,05$  (CRH vs. vehículo); +,  $P < 0,05$  (vehículo 2 días post-bombeo vs. vehículo 1 día post-bombeo); ‡,  $P < 0,05$  (7 días post-bombeo vs. 2 días post-bombeo); test de Duncan de rango múltiple.



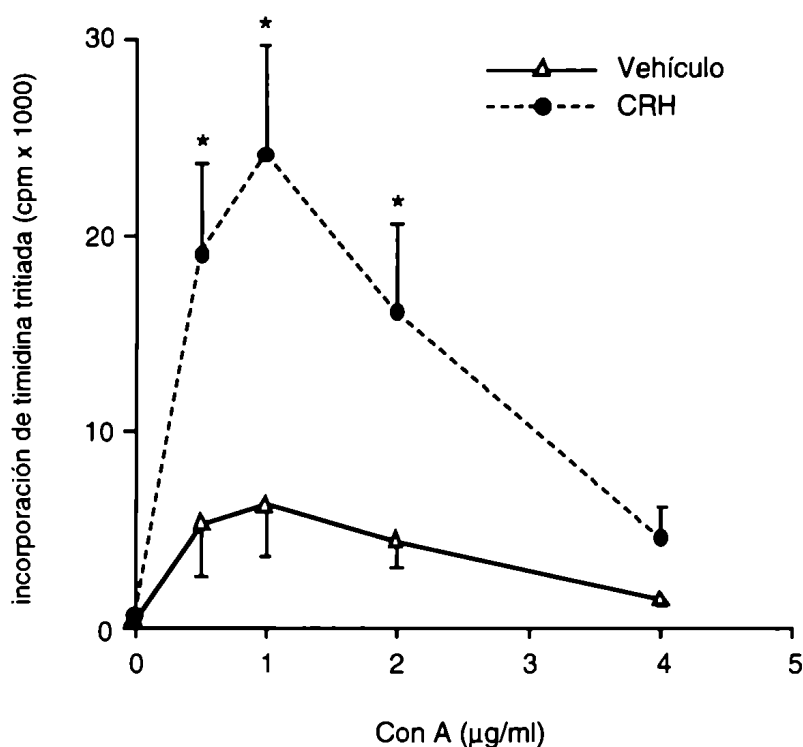
**Figura 25.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH sobre el peso del timo en los días 0, 1, 2 y 7 después de finalizado el período de infusión. El días 0 post-bombeo corresponde al día 7 del período de infusión (tabla 5). Los datos están expresados como el promedio  $\pm$  ES (n = 6 para los días 1, 2 y 7 post-bombeo). ANOVA: efecto del tiempo:  $F(3, 50) = 5,286$ ,  $P < 0,003$ , efecto del tratamiento (CRH vs vehículo):  $F(1, 50) = 113,798$ ,  $P < 0,0005$ . \*,  $P < 0,05$  (CRH vs. vehículo); +,  $P < 0,05$  (CRH 2 días post-bombeo vs. CRH 1 día post-bombeo); test de Duncan de rango múltiple.

### 4.3.3. Proliferación de esplenocitos y producción de IL-2 y del IL-2R $\alpha$ *in vitro*

#### 4.3.3.1. 1 día post-bombeo

Como se indicó anteriormente la proliferación linfocitaria inducida por diferentes concentraciones del mitógeno Con A, se encontró suprimida en el día 7 de la infusión crónica central de CRH respecto a la observada en los animales que recibieron el vehículo. Contrariamente, se observó un aumento dramático de la respuesta proliferativa en los esplenocitos de las ratas sacrificadas 1 día después de finalizado el período de infusión (figura 26).

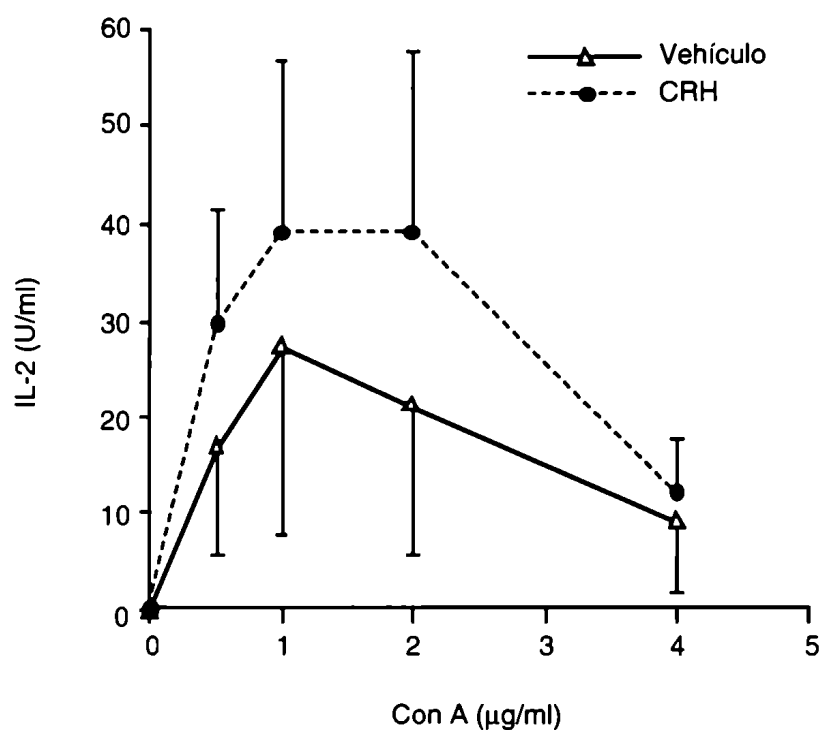




**Figura 26.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH en ratas, sobre la proliferación de esplenocitos un día después de terminada la infusión. Los datos se presentan como curvas dosis-respuesta de Con A. La proliferación de los esplenocitos está expresada como la incorporación de timidina tritiada en cpm (promedio  $\pm$  ES,  $n = 5$  a  $6$ ). ANOVA: A, efecto de la concentración de Con A:  $F(4, 45) = 8,268$ ,  $P = 0,0005$ ; efecto del tratamiento (CRH vs. vehículo):  $F(1,45) = 20,692$ ,  $P = 0,0005$ . \*,  $P < 0,05$  (CRH vs. vehículo), test de Duncan de rango múltiple.

Se estudiaron los niveles de IL-2 en los sobrenadantes de esplenocitos provenientes de las ratas sacrificadas 1 día después de terminado el período de infusión crónica icv de CRH, para ver si hubiera una correspondencia con los altos niveles proliferativos observados en estos animales. Se midió la concentración de IL-2 en sobrenadantes de esplenocitos incubados durante 18 y 48 horas en la presencia de Con A. La figura 27 muestra el efecto de varias concentraciones de Con A sobre los niveles de IL-2 luego de 48 horas de incubación de los esplenocitos. Los niveles de IL-2 en cultivos de células por 18 horas (datos no mostrados) fueron similares a los obtenidos luego de 48 horas de cultivo. En el día 1 después del período de infusión icv, los niveles de IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos estimulados por Con A no

fueron significativamente diferentes entre las ratas infundidas con CRH y las tratadas con el vehículo.



**Figura 27.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH sobre la producción de IL-2 inducida por Con A, 1 día después de finalizado el período de infusión. Los datos están expresados como U/ml (promedio  $\pm$  ES, n=5 a 6). ANOVA: A, efecto de la concentración de Con A:  $F(4, 45) = 2,455$ ,  $P = 0,059$ ; efecto del tratamiento (CRH vs. vehículo):  $F(1, 45) = 1,277$ ,  $P = 0,265$ .

Se estudió la expresión del IL-2R $\alpha$  a nivel del ARNm y de la proteína en esplenocitos estimulados por Con A provenientes de las ratas sacrificadas 1 día después de terminado el período de infusión crónica icv de CRH. Este estudio se realizó con el fin de determinar el rol del IL-2R $\alpha$  en los altos niveles proliferativos de los esplenocitos provenientes de las ratas infundidas con CRH y sacrificadas en el día 1 post-bombeo.

El ARNm del IL-2R $\alpha$  obtenido de esplenocitos estimulados por 24 horas con Con A, se ve en la figura 28A. Se observaron diferencias en la expresión del ARNm del IL-2R $\alpha$  entre las ratas infundidas con CRH y las tratadas con el vehículo, únicamente cuando los esplenocitos fueron estimulados con la concentración de Con A 0,5 µg/ml pero no cuando lo fueron con la de 1 µg/ml. En la concentración de Con A de 0,5 µg/ml, los esplenocitos provenientes de las

ratas tratadas con CRH muestran una mayor expresión del IL-2R $\alpha$  comparada con la de los animales infundidos con el vehículo (figura 28).

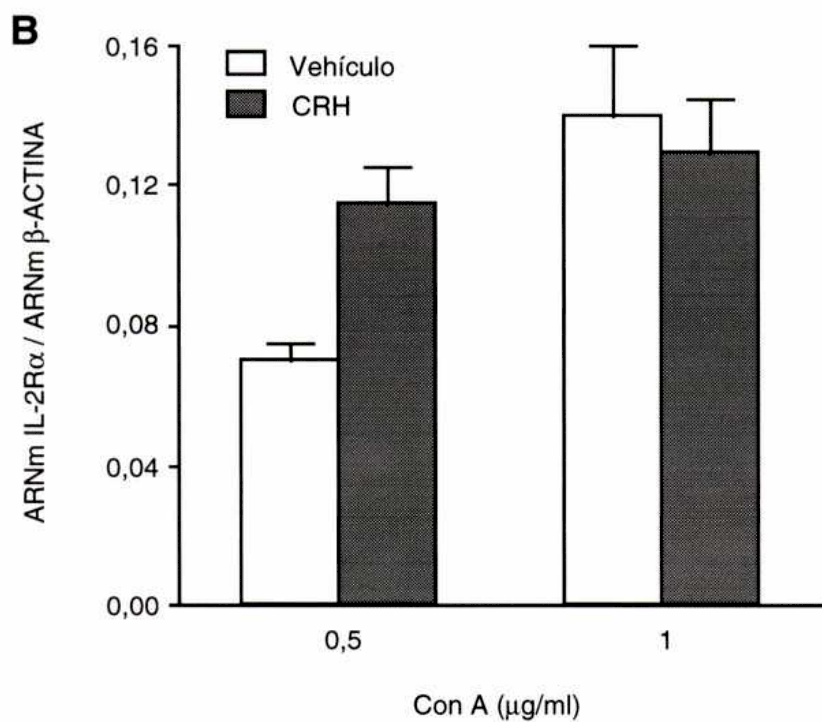
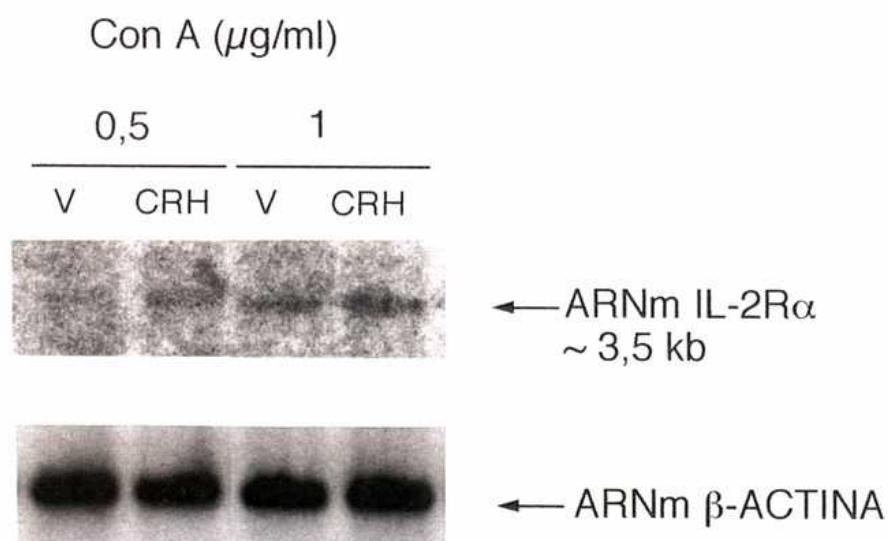
Mediante técnicas de análisis por doble-inmunofluorescencia, se determinaron los niveles proteicos del IL-2R $\alpha$  sobre la superficie celular de esplenocitos TcR $\alpha\beta^+$  y CD4 $^+$  cultivados en la presencia de Con A durante 24, 48 y 72 horas. No fueron detectadas diferencias en los niveles proteicos del IL-2R $\alpha$  cuando las ratas infundidas con CRH son comparadas con las tratadas con el vehículo (figura 29).

#### 4.3.3.2. 2 días post-bombeo

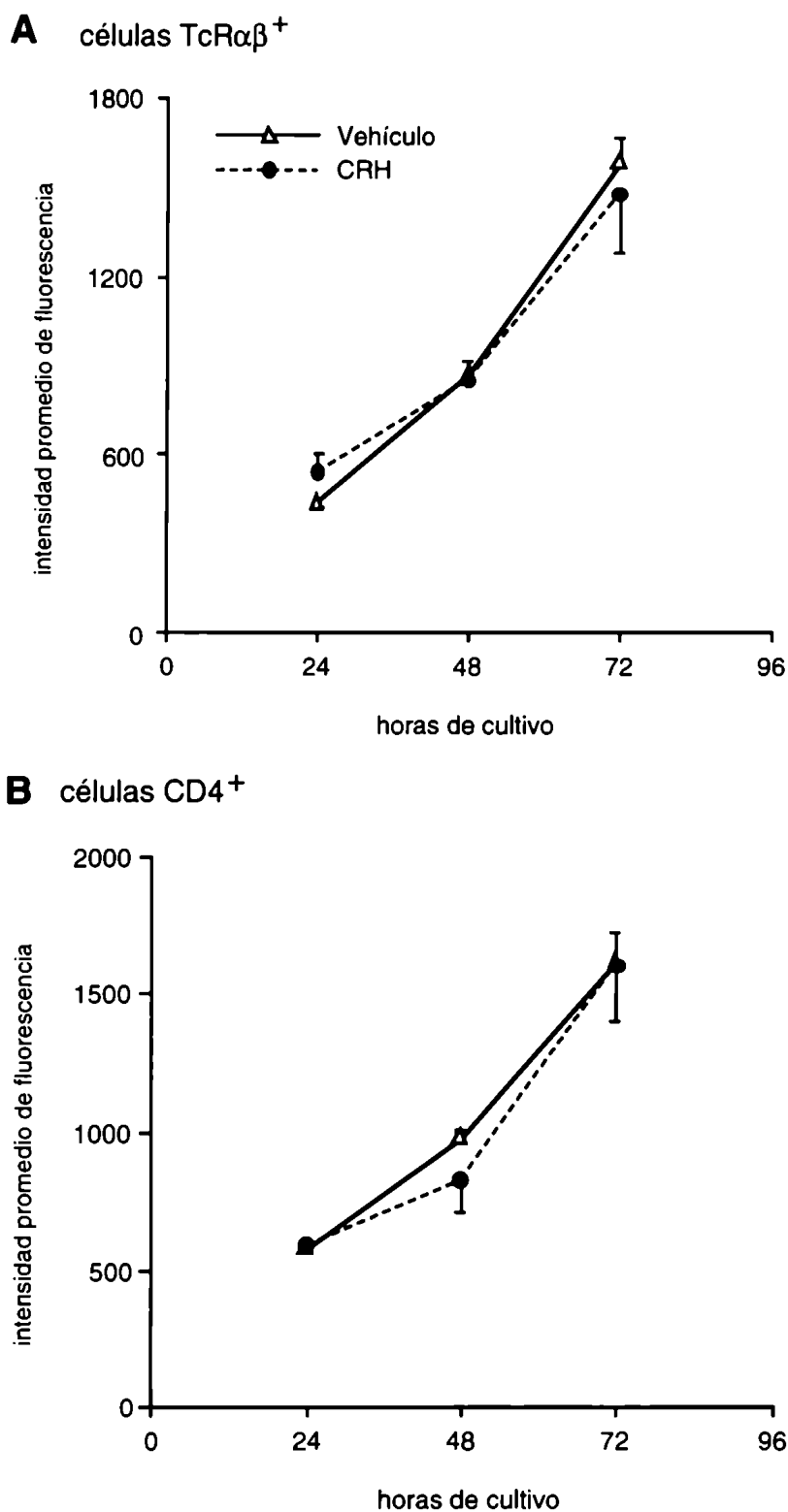
Como se indicó anteriormente, se observó un aumento dramático de la respuesta proliferativa en los esplenocitos de las ratas sacrificadas 1 día después de finalizado el período de infusión. Contrariamente, 2 días después de terminado el período de infusión icv, los niveles proliferativos de esplenocitos en respuesta al mitógeno Con A no son significativamente diferentes en las ratas administradas con CRH respecto de la proliferación de los esplenocitos encontrada en los animales infundidos con el vehículo (figura 30A). Del mismo modo, en los sobrenadantes de esplenocitos estimulados con Con A por 18 (datos no mostrados) o por 48 horas, tanto en los de las ratas tratadas con la CRH como en los de los animales tratados con el vehículo, se encontraron niveles semejantes de IL-2 (Fig. 30B).

#### 4.3.3.3. 7 días post-bombeo

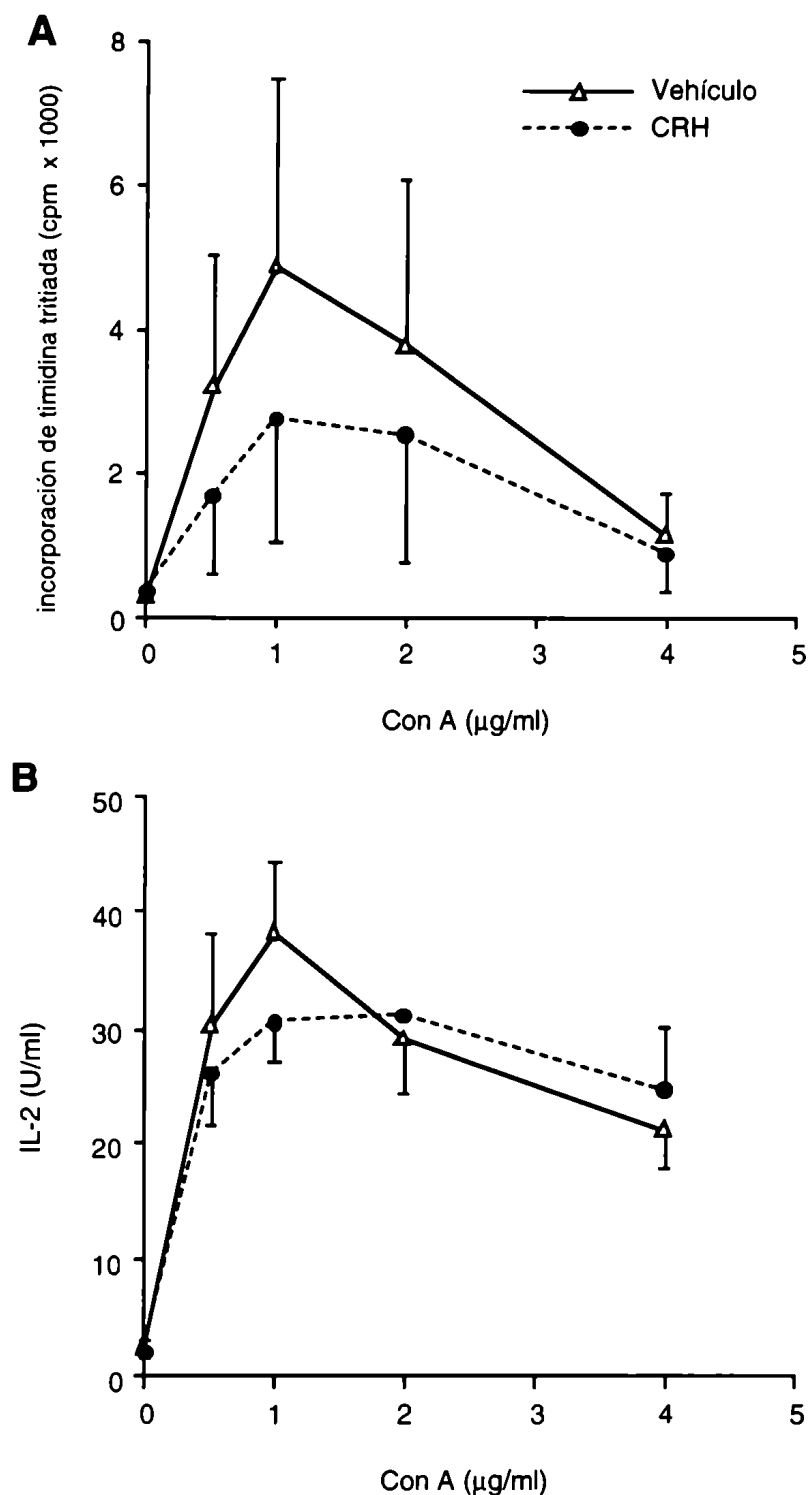
Se investigó si la proliferación y la producción de IL-2 en respuesta a diferentes concentraciones de Con A, estaba afectada en el día 7 después de terminada la semana de infusión central con la hormona CRH. En el día 7 post-bombeo, la respuesta proliferativa de los linfocitos T obtenidos de las ratas infundidas con CRH es similar a la observada en los animales tratados con el vehículo (figura 31A). La incubación de los linfocitos con el mitógeno de células T, Con A, por 48 horas, produjo niveles de IL-2 semejantes en las ratas tratadas con CRH como en las infundidas con el vehículo (figura 31B). Los niveles de IL-2 determinados en cultivos de esplenocitos estimulados por Con A e incubados por 18 horas (datos no mostrados) fueron similares a los encontrados al cabo de 48 horas de incubación.

**A**

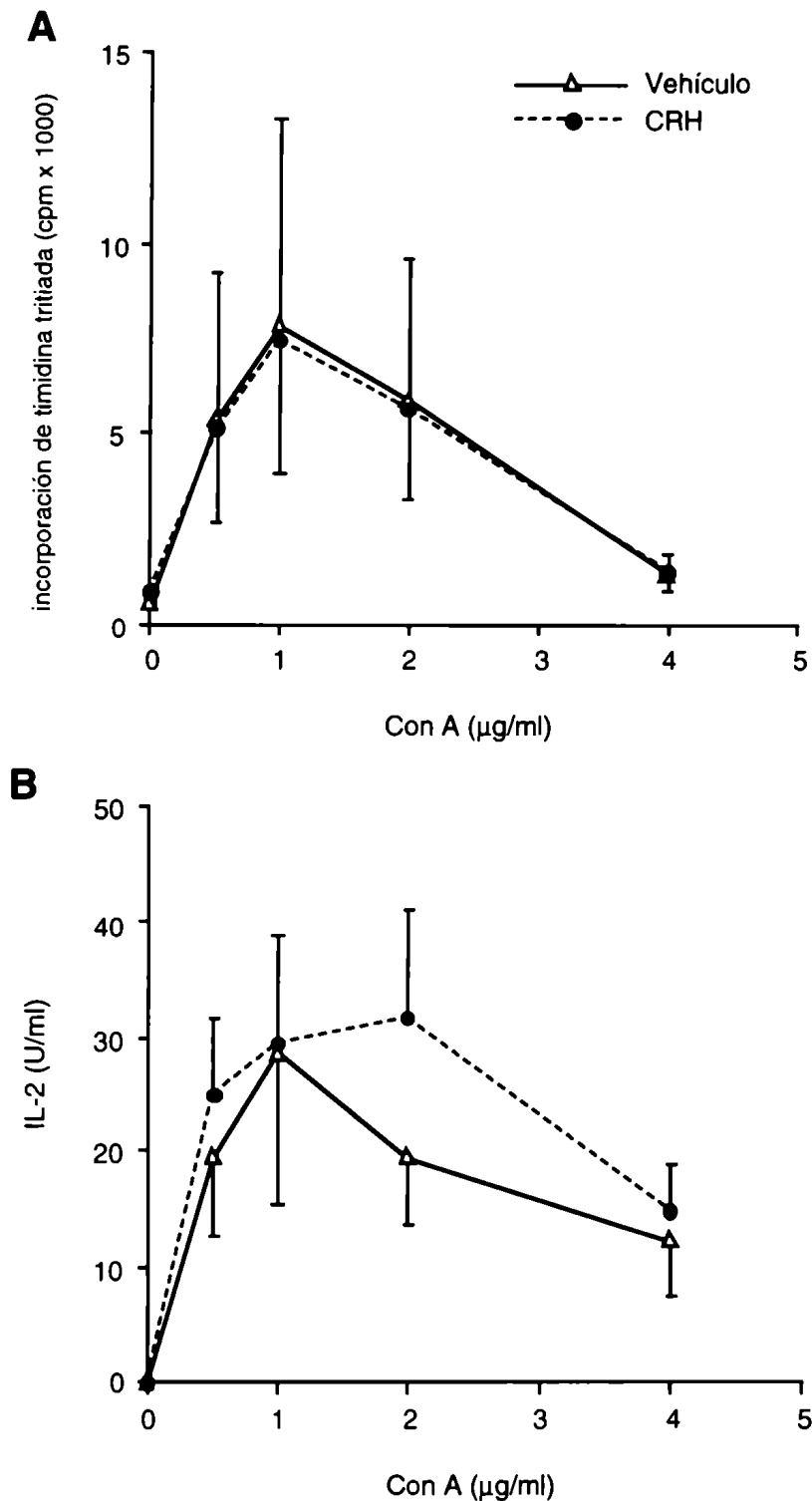
**Figura 28.** Efecto de la infusión crónica icv con CRH o el vehículo (V) sobre la expresión del ARNm del IL-2R $\alpha$  inducido por Con A en esplenocitos, 1 día después de finalizado el período de infusión. A, análisis por Northern blot del ARNm del IL-2R $\alpha$  y de  $\beta$ -actina (20  $\mu\text{g}$  de ARN total/calle). B, análisis semicuantitativo del contenido de ARNm de IL-2R $\alpha$ . Los datos (promedio  $\pm$  ES, n = 3) se encuentran expresados como la relación entre las señales obtenidas por autoradiografías del ARNm del IL-2R $\alpha$  y de  $\beta$ -actina.



**Figura 29.** Efecto de la infusión crónica icv con CRH sobre la expresión proteica del IL-2R $\alpha$  en la superficie celular de esplenocitos TcR $\alpha\beta^+$  (A) y CD4 $^+$  (B), 1 día post-bombeo. Las células fueron estimuladas por 24, 48 y 72 horas en la presencia de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de Con A y analizadas por doble-inmunofluorescencia. Los resultados se encuentran expresados como la intensidad promedio de fluorescencia ( $n = 3$ ). ANOVA: A, efecto del tiempo:  $F(2,12) = 97,452$ ,  $P = 0,0005$ ; efecto del tratamiento:  $F(1,12) = 0,095$ ,  $P = 0,763$ . B, efecto del tiempo:  $F(2,12) = 52,390$ ,  $P = 0,0005$ ; efecto del tratamiento:  $F(1,12) = 0,143$ ,  $P = 0,711$ .



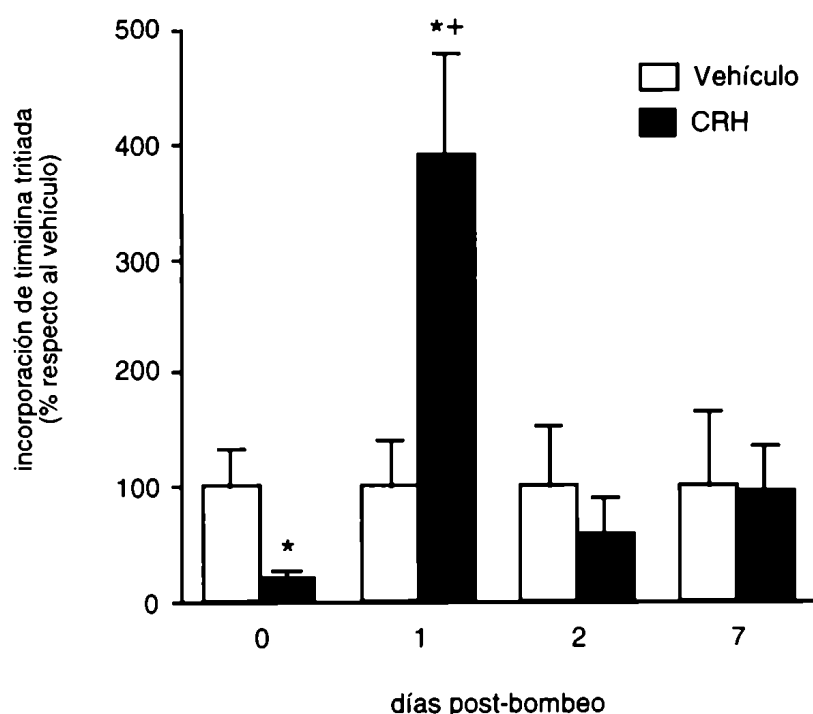
**Figura 30.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH en ratas, sobre la proliferación de esplenocitos y la producción de IL-2 inducida por Con A, 2 días después de transcurrido el período de infusión. Los datos están representados como curvas de dosis-respuesta de Con A. A, la proliferación de los esplenocitos se muestra como la incorporación de timidina tritiada en cpm (promedio  $\pm$  ES, n = 5 a 6). B, la producción de IL-2 está expresada en U/ml (promedio  $\pm$  ES, n = 3 a 4). ANOVA : A, efecto sobre la concentración de Con A:  $F(4, 45) = 1,840$ ,  $P < 0,138$ ; efecto sobre el tratamiento (CRH vs vehículo) =  $F(1, 45) = 1,171$ ,  $P < 0,285$ . B, efecto sobre la concentración de Con A:  $F(4, 25) = 18,041$ ,  $P < 0,0005$ ; efecto sobre el tratamiento (CRH vs vehículo):  $F(1, 45) = 0,248$ ,  $P < 0,623$ .



**Figura 31.** Efecto de la infusión crónica icv de CRH en ratas, sobre la proliferación de esplenocitos y la producción de IL-2 inducida por Con A, 7 días después de transcurrido el período de infusión. Los datos están representados como curvas de dosis-respuesta de Con A. A, la proliferación de los esplenocitos está expresada como la incorporación de timidina tritiada en cpm (promedio  $\pm$  ES,  $n = 5$  a  $6$ ). B, los datos de producción de IL-2 están expresados como U/ml (promedio  $\pm$  ES,  $n = 5$  a  $6$ ). ANOVA : A, efecto sobre la concentración de Con A:  $F(4, 45) = 2,295$ ,  $P < 0,074$ ; efecto sobre el tratamiento (CRH vs vehículo) =  $F(1, 45) = 0,004$ ,  $P < 0,952$ . B, efecto sobre la concentración de Con A:  $F(4, 45) = 5,311$ ,  $P < 0,001$ ; efecto sobre el tratamiento (CRH vs vehículo):  $F(1, 45) = 0,835$ ,  $P < 0,366$ .

#### 4.3.3.4. Proliferación de esplenocitos y producción de IL-2 en función del tiempo

En la figura 32 se encuentra graficada, en forma comparativa, la proliferación de los linfocitos T inducida por 1  $\mu\text{g/ml}$  del mitógeno Con A en el día 7 del período de infusión icv (día 0 post-bombeo) y en los días 1, 2 y 7 después de transcurrido dicho período. A diferencia de la respuesta mitogénica altamente reducida observada en los esplenocitos obtenidos en el día 7 de la infusión con CRH, en el día 1 post-bombeo, la proliferación de los linfocitos de las ratas infundidas con la CRH estuvo marcadamente elevada respecto a la de las ratas infundidas con el vehículo. En el día 2 y 7 después del período de infusión icv, la proliferación estimulada por Con A de los linfocitos obtenidos de ratas infundidas con CRH no muestra diferencias significativas respecto de los animales tratados con el vehículo (figura 32).

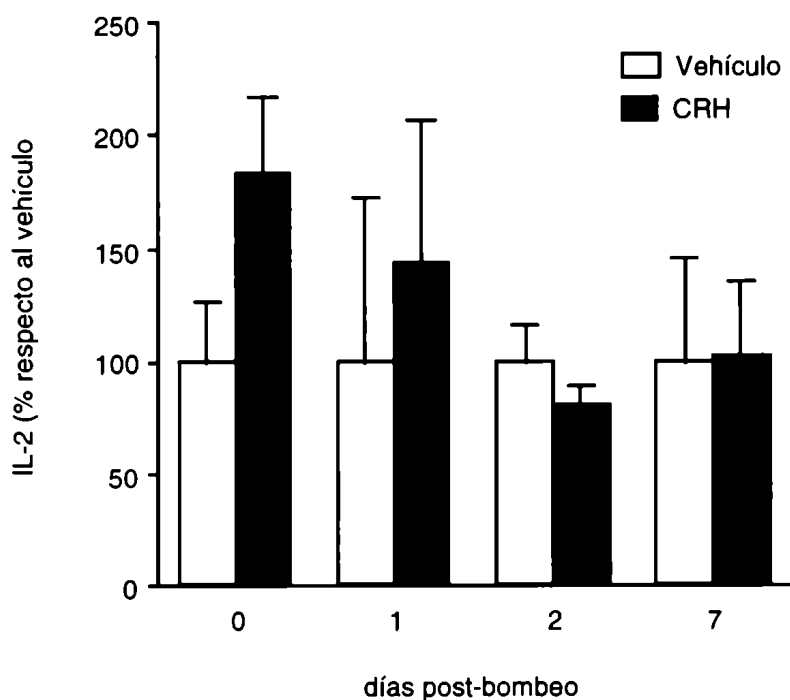


**Figura 32.** Efecto de la infusión crónica icv por 7 días de CRH sobre la proliferación de esplenocitos en ratas sacrificadas en los días 0, 1, 2 y 7 post-bombeo. La proliferación de los esplenocitos inducida por 1  $\mu\text{g/ml}$  de Con A, se encuentra representada en la figura como % de incorporación de timidina tritiada de las ratas tratadas con CRH respecto de las tratadas con el vehículo ( $n = 5$  a  $8$ ). ANOVA: efecto del tiempo:  $F(3,41) = 3,043$ ,  $P = 0,039$ ; efecto del tratamiento (vehículo vs CRH):  $F(1,41) = 0,076$ ,  $P = 0,785$ . \*,  $P < 0,05$  (CRH vs vehículo); +,  $P < 0,05$  (CRH1 día post-bombeo vs CRH 0, 2 y 7 días post-bombeo); test de Duncan de rango múltiple.



Es decir que la absoluta reversión de la inhibición en la proliferación linfocitaria causada por la infusión crónica central de CRH, se observa sólo 1 día después de terminada la infusión con la hormona y no 2 ó 7 días después de transcurrido el período de infusión. En los días 2 y 7 post-bombeo sólo se previene la supresión de la proliferación originada por la infusión de CRH.

Del mismo modo en que se graficó en forma comparativa la proliferación de los esplenocitos obtenidos en el día 7 del período de infusión y en los días 1, 2 y 7 después del mismo, en la figura 33 se encuentra graficada la producción de IL-2 en los sobrenadantes de células incubadas por 48 horas con 1  $\mu\text{g/ml}$  de Con A. En el día 7 de la infusión se determinó una mayor producción de IL-2 en los sobrenadantes de los esplenocitos obtenidos de las ratas infundidas con CRH respecto de las ratas infundidas con el vehículo. En los días 1, 2 y 7 después de transcurrido el período de infusión icv, la producción de IL-2 por los linfocitos obtenidos de ratas infundidas con CRH no muestra diferencias significativas respecto de la de los animales tratados con el vehículos (figura 33).

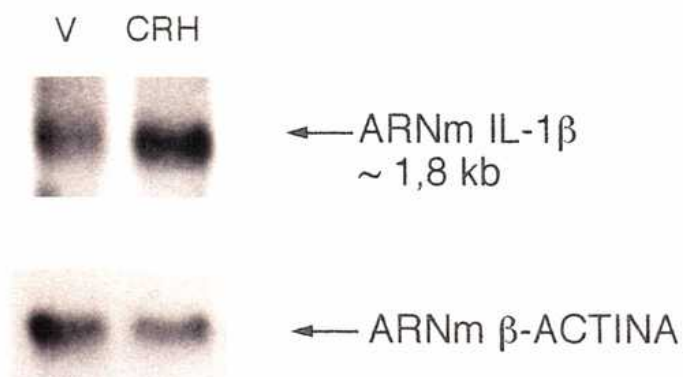
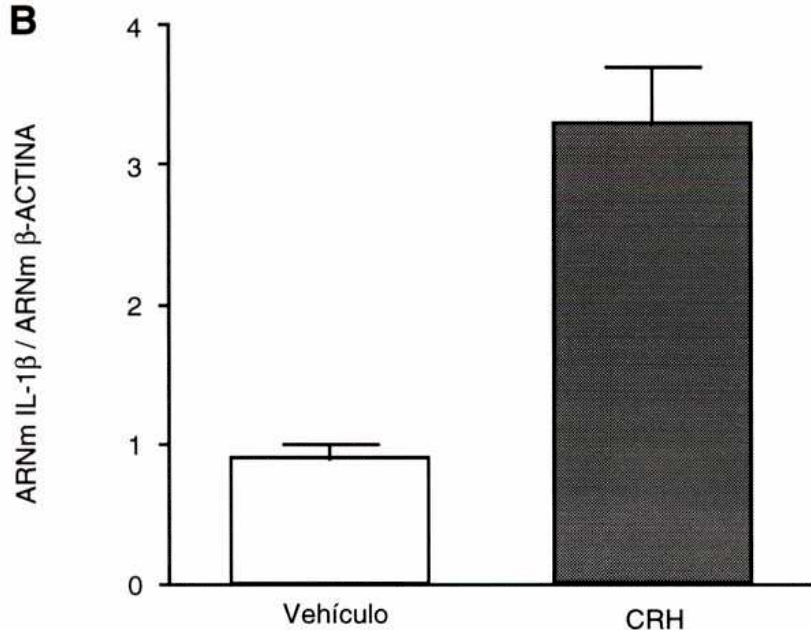


**Figura 33.** Efecto de la infusión crónica icv por 7 días de CRH sobre la producción de IL-2 en sobrenadantes de esplenocitos provenientes de ratas sacrificadas en los días 0, 1, 2 y 7 post-bombeo. El día 0 post-bombeo corresponde al día 7 del período de infusión. Los datos están expresados como % de producción de IL-2 de las ratas infundidas con CRH respecto de las tratadas con el vehículo (n= 3 a 7). ANOVA: efecto del tiempo:  $F(3,29) = 0,513$ ,  $P = 0,677$ ; efecto del tratamiento (vehículo vs CRH):  $F(1,29) = 0,247$ ,  $P = 0,623$ .

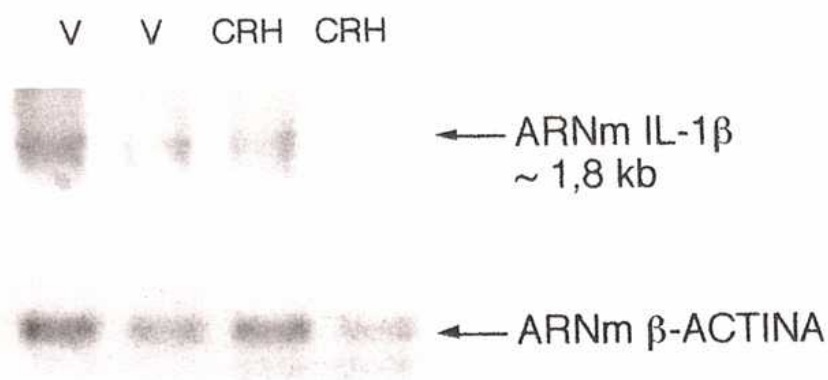
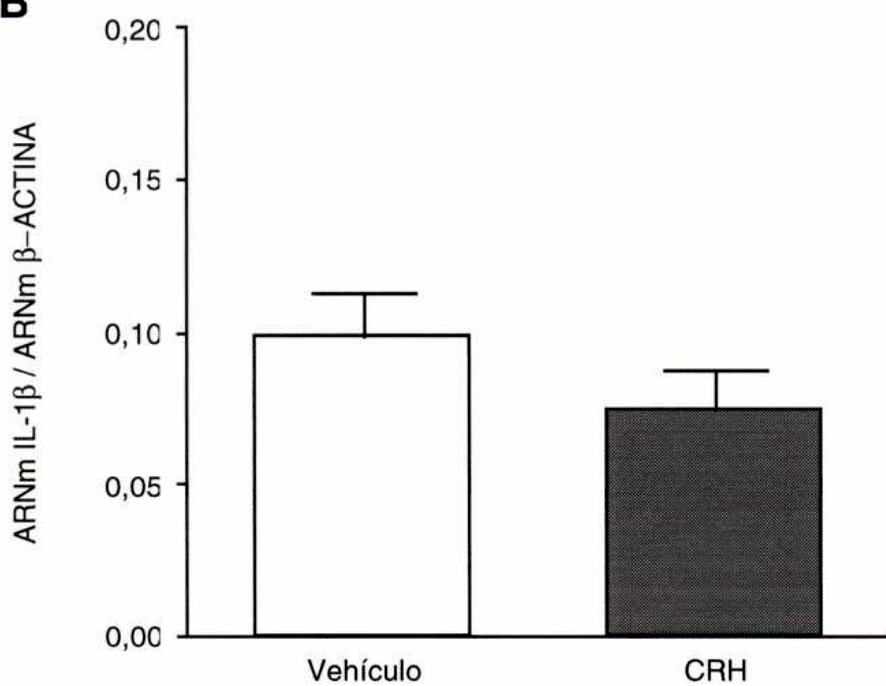
#### **4.3.4. Expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ en esplenocitos**

Se investigó si la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$  en esplenocitos aislados del bazo 1 día después de terminado el período de infusión icv con CRH estuviera modificada respecto a los animales infundidos con el vehículo. La figura 34 muestra la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ , la cual se encuentra aumentada en los animales tratados con CRH respecto a los infundidos con el vehículo.

Sin embargo, 7 días después de terminado el período de infusión, la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$  en esplenocitos obtenidos de ratas infundidas con CRH es semejante a la encontrada en animales infundidos con el vehículo (figura 35). Así, siete días después del período de infusión icv con CRH se produce la normalización de los efectos inducidos por la hiperactivación del eje HPA en los niveles del ARNm de la IL-1 $\beta$ .

**A****B**

**Figura 34.** A, Expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  en esplenocitos de ratas tratadas icv con CRH o con el vehículo (V) durante 7 días y sacrificadas 1 día después del tratamiento. A, análisis por Northern Blot del ARNm (20  $\mu$ g de ARN total/calle) de IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina. B, análisis semicuantitativo del contenido del ARNm de IL-1 $\beta$  (promedio  $\pm$  ES, n=3). Los datos están expresados como la relación entre las señales obtenidas en las autorradiografías del ARNm de IL-1 $\beta$  y de  $\beta$ -actina.

**A****B**

**Figura 35.** Expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  en esplenocitos de ratas tratadas icv con CRH o con el vehículo (V) por 7 días y sacrificadas 7 día después del tratamiento. A, análisis por Northern Blot del ARNm (20  $\mu$ g de ARN total/calle) de IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina. B, análisis semicuantitativo del contenido del ARNm de IL-1 $\beta$ . Los datos (promedio  $\pm$  ES, n=3) están expresados como la relación entre las señales obtenidas en las autoradiografías del ARNm de IL-1 $\beta$  y de  $\beta$ -actina.

## 5. Discusión

Los modelos animales representan una herramienta experimental que provee numerosas ventajas para la investigación preclínica. Se desarrollan en una especie con el propósito de estudiar fenómenos biológicos tanto en la misma como en otras especies, en particular en el humano. Permiten un mayor control y aislamiento de las variables experimentales importantes. Son modelos seguros y reproducibles donde se pueden evaluar y diseñar nuevas estrategias de tratamientos farmacológicos, como también intervenciones directas en el SNC. Con el fin de estudiar el impacto de una desregulación del eje HPA en las funciones neuroendócrinas e inmunes, y en las características físicas, se estableció y utilizó un modelo animal de infusión crónica central de CRH. Este podría ser considerado como un modelo de estudio de los efectos del estrés crónico. La mayoría de los estudios dedicados a esclarecer el estrés crónico y sus consecuencias, utilizan un estrés agudo repetido por varios días, llevando en muchos casos al fenómeno de habituación o adaptación del eje HPA, lo que resulta en una respuesta atenuada del mismo (Harbuz & Lightman, 1992). Por otro lado, mientras que las propiedades inmunosupresivas del estrés agudo se hallan bien establecidas (Monjan & Collector, 1977), los efectos del estrés crónico sobre el sistema inmune no han sido ampliamente estudiados. Para elucidar esta última interacción se investigaron distintos parámetros inmunes: la activación linfocitaria (a través de la respuesta proliferativa de esplenocitos), la expresión de citoquinas y sus receptores, y la presencia de distintas subpoblaciones linfocitarias.

La infusión crónica de CRH en el ventrículo lateral de la rata produce cambios pronunciados en el eje HPA, en el sistema inmune y en los parámetros físicos.

### 5.1. Hormonas del eje HPA

Los cambios endócrinos resultantes del tratamiento con CRH durante 7 días incluyen un aumento en los niveles circulantes de ACTH y de corticosterona, expresión elevada del ARNm de POMC en la pituitaria anterior y aumento del tamaño de las glándulas adrenales; los cuales son índices de una hiperactivación sostenida del eje HPA. En los días 1 y 7 después de terminado el período de infusión con CRH, se observó una disminución substancial en los niveles circulantes de ACTH, alcanzando valores similares a los observados en las ratas tratadas con el vehículo. Sin embargo, en el día 2 después del período de infusión, los niveles plasmáticos de ACTH en las ratas tratadas con CRH

estuvieron nuevamente elevados, mostrando niveles semejantes a los observados en el día 7 del período de infusión. En los animales infundidos en forma crónica con CRH, los niveles de corticosterona plasmáticos disminuyen a partir del día 1 luego de terminado el período de infusión pero siguen siendo más altos que aquellos detectados en las ratas tratadas con el vehículo. Este aumento persistente en los niveles de corticosterona podría ser una consecuencia del tamaño aumentado de las glándulas adrenales en dichos grupos, aunque dichas glándulas, en el día 7 post-bombeo, tiene un tamaño semejante al de las encontradas en las ratas tratadas con el vehículo.

La exposición prolongada de receptores hormonales presentes en las células blanco, a altos niveles del ligando, provoca cambios regulatorios en los niveles de dichos receptores. De este modo, cambios en la afinidad y/o el número de los CRHR, como también en la síntesis de CRH endógena pueden ser esperados como consecuencia de la infusión crónica de CRH, tanto durante como después de finalizado el período de infusión. Distintos factores, además de los ya mencionados, podrían contribuir, por otro lado, a la regulación del eje durante y luego de la infusión por 7 días con la hormona. Entre otros, cambios en los niveles de RG, en los niveles plasmáticos de corticosterona, en neurotransmisores y en los niveles de AVP.

La concentración del CRHR en la pituitaria anterior disminuye durante estados de liberación aumentada de CRH por el hipotálamo dentro de la circulación portal como por ej. en el caso de la adrenalectomía (Suda et al., 1983), presumiblemente por un proceso de disminución en la concentración de los receptores vía la inducción del ligando (Vale et al., 1983; Wynn et al., 1984; DeSouza, 1989). Por otro lado cambios en la sensibilidad del CRHR son observados, cuando los mismos se encuentran en la presencia de niveles aumentados de CRH (Wynn et al., 1988). Se ha demostrado que la infusión subcutánea por minibombas osmóticas de 100 ng/min de CRH por 48 horas produce un 40% de reducción en los CRHR de la pituitaria anterior (Hauger & Aguilera, 1993). Por otro lado el estrés crónico reduce significativamente el número de sitios de unión ( $B_{max}$ ) de CRH, en el lóbulo anterior de la pituitaria, el gyrus dentado, las áreas CA1-CA3 del hipocampo, y en el stratum griseum superficiale y el stratum opticum del colliculus superior (Fuchs & Flügge, 1995). La regulación fisiológica de la secreción de ACTH es dependiente de los efectos interactivos de CRH y AVP en los corticotrofos de la pituitaria (Gillies & Lowry, 1979; Rivier & Vale, 1983; Harbuz & Lightman, 1992; De Coeij et al., 1992). La activación crónica de la AVP endógena originaria en las células parvocelulares,

pero no en las magnocelulares, potencia la pérdida del número de CRHR en la pituitaria (Hauger & Aguilera, 1993). El estudio, en el presente trabajo, de cambios en los niveles de CRHR en la pituitaria anterior de ratas tratadas icv en forma crónica con CRH, ayudaría a explicar los mecanismos implicados en la alteración del patrón de secreción de ACTH y corticosterona por el eje HPA. Podría esperarse una disminución en los receptores presentes en la pituitaria, como también en la producción endógena de CRH, como consecuencia de la infusión permanente del péptido. De este modo, en las ratas infundidas en forma crónica con la CRH, el quite agudo de la CRH exógena 1 día después de transcurrido el período de infusión, resulta en niveles de ACTH y de corticosterona relativamente más bajos. En el día 2 después de transcurrido el período de infusión, los altos niveles de ACTH observados podrían ser la consecuencia de, no sólo un aumento en la expresión de los receptores de CRH sino también de la activación en la síntesis de CRH endógena.

Un rol destacado de la AVP, en los fenómenos de estrés crónico, es sugerido por numerosos estudios. Hashimoto *et al.*, reportan en 1988, que en ratas con estrés crónico por inmovilización, la CRH exógena no tiene efecto sobre la ACTH plasmática, aunque las concentraciones de corticosterona aumentan en respuesta a un estrés agudo. La AVP exógena, sin embargo, provoca una respuesta elevada de ambas hormonas (ACTH y corticosterona). Por otro lado, se ha sugerido que la AVP endógena es esencial para mantener la respuesta al estrés del eje HPA, cuando la pituitaria no responde a la estimulación por CRH (Hashimoto *et al.*, 1988; Scaccianoce *et al.*, 1991). La importancia de la AVP, como regulador de la respuesta de la glándula pituitaria en condiciones de estrés crónico, se recalca también en otros modelos donde el eje HPA se encuentra alterado. Durante el desarrollo de la artritis inducida por adyuvante, la activación del eje HPA se produce en respuesta a AVP y no a CRH. Este mismo patrón de respuestas fue encontrado en el modelo de EAE modelo animal de la esclerosis múltiple (Leonard *et al.*, 1993). Aunque hasta el momento no se han estudiado los niveles endógenos de AVP en este modelo animal, éstos podrían tener un papel importante en la modulación del eje debido a su interacción con la CRH.

Por otro lado, no puede excluirse una contribución por parte de los glucocorticoides y sus receptores a la regulación del eje HPA, como tampoco la posible modulación del mismo por distintos neurotransmisores. El eje HPA es extremadamente sensible a pequeños cambios en los niveles de corticosterona, tanto en términos de actividad basal como bajo respuestas al estrés. La

respuesta del eje HPA, específicamente la liberación central del complejo hipotalámico CRH/AVP, el cual regula la secreción de la ACTH, estaría influenciada por las acciones de retroalimentación negativa llevada a cabo por los esteroides adrenales actuando a nivel central y de la pituitaria. Por otro lado regiones límbicas centrales parecerían también estar involucradas en dichas acciones regulatoria. El estudio de los niveles de RG y RM en distintas áreas del SNC y en la pituitaria podría resultar de suma utilidad en el entendimiento de los cambios observados durante y luego del período de infusión crónica icv de CRH.

Diferentes tipos de estrés activan diferentes caminos eferentes hacia el núcleo paraventricular. Presumiblemente, diferencias en la liberación de distintos neurotransmisores de las terminales de esas vías, resultan en una activación diferencial de distintos transcritos en las células parvocelulares del núcleo paraventricular (Lightman & Harbuz, 1993).

## **5.2. Parámetros físicos**

Las ratas tratadas icv por 7 días con la hormona CRH aumentan, durante y luego del tratamiento, significativamente menos de peso que los animales controles. Dicha disminución podría resultar de una reducción en la alimentación de las ratas tratadas en forma crónica con CRH (Hotta et al., 1991). Por otro lado el efecto inhibitorio de CRH sobre el aumento del peso corporal podría también ser la consecuencia de no sólo una disipación energética por un aumento en la actividad locomotora (Sutton et al., 1982), sino también pérdida de peso debido a los efectos catabólicos de los glucocorticoides y a un aumento en la actividad del sistema nervioso simpático (Arase et al., 1988). Anticuerpos anti-CRH o el antagonista del CRHR ( $\alpha$ -CRH helicoidal) revierten la reducción en la alimentación inducida por el estrés por restricción (Hotta et al., 1991). Dichas observaciones sugieren que los cambios en la liberación de CRH endógena inducidas por un estresor juegan un importante rol en la anorexia provocada por el estrés.

Los glucocorticoides están descriptos como hormonas inhibidoras del crecimiento (Munck et al., 1984). En el modelo animal presentado en este trabajo, la hiperactividad del eje HPA, resulta en el día 7 del período de infusión en una reducción del peso del bazo y del timo y en un aumento del peso de las glándulas adrenales, lo cual parecería ser una consecuencia directa de la exposición continua a altas concentraciones de glucocorticoides (Dallman et al., 1987). Ya en el año 1936, fue demostrado que distintos tipos de estrés causa-



ban un aumento en la masa de la glándula adrenal como también la atrofia del timo, y que dicha atrofia se encuentra disminuída en ratas adrenalectomizadas o hipofisectomizadas, revelando al eje pituitario-adrenal, como un centro de control entre los sistemas nervioso e inmune (Munck & Guyre, 1991). En 1940, Ingle, Wells y Kendall mostraron que la involución del timo se observaba luego de la administración de esteroides purificados extraídos de la corteza adrenal, identificando la actividad con aquellos esteroides que posteriormente fueron llamados glucocorticoides (Munck & Guyre, 1991). El efecto de los glucocorticoides en la migración y redistribución de los leucocitos ha recibido, en el pasado, una atención considerable; sin embargo, los mecanismos y el significado de este fenómeno en términos de inmunoregulación no están aún entendidos (Cupps & Fauci, 1982; Munck & Guyre, 1991). También queda por ser elucidado el significado de los efectos de los glucocorticoides sobre la morfología del tejido linfoideo, en particular la involución del timo. Hasta el presente se cuenta con muy poca evidencia si los glucocorticoides afectan el rol central del timo en la selección de receptores antigénicos en las células T (Munck & Guyre, 1991). En humanos, los cambios morfológicos observados en el timo pueden ser debidos principalmente a cambios en el tráfico celular (Cupps & Fauci, 1982), mientras que en roedores la muerte de los linfocitos es importante (Munck & Crabtree, 1981).

Después del período de infusión con la hormona CRH, el timo sigue siendo más pequeño que el de las ratas tratadas con el vehículo. Sin embargo, se ve una recuperación significativa de su peso a partir del día 2 post-bombeo. Dicho aumento de peso podría deberse a la disminución de los niveles de corticosterona circulantes a partir de la finalización de la infusión central con CRH. De un modo similar, en las ratas tratadas con CRH, el peso de las glándulas adrenales se normaliza entre el día 2 y el 7 post-bombeo. Nuevamente, el cambio en los niveles de glucocorticoides circulantes podría afectar el peso de la glándulas adrenales.

### **5.3. Parámetros inmunes**

Respecto al significado funcional para el sistema inmune, tanto durante el tratamiento continuo con CRH icv como en el período post-bombeo, se encontraron efectos diferentes sobre la expresión de citoquinas y de sus receptores, y sobre la proliferación de esplenocitos.

### 5.3.1. Proliferación de esplenocitos *in vitro*

Como parámetro de la activación linfocitaria, se midió la proliferación de los esplenocitos en cultivos llevados a cabo *in vitro* bajo el estímulo de diferentes mitógenos.

La respuesta proliferativa de los esplenocitos al mitógeno Con A, *in vitro*, se encuentra inversamente correlacionada con los niveles plasmáticos de corticosterona y de ACTH durante el período de infusión y 1 día después de concluido dicho período. Se encontró que la respuesta proliferativa en esplenocitos provenientes de los animales tratados centralmente con CRH por 7 días, estuvo altamente suprimida. La mitogénesis inducida tanto por Con A (mitógeno de células T) como por LPS (mitógeno de células B) estuvo atenuada por la infusión crónica con el péptido. Debido a que los glucocorticoides son inhibidores potentes de la proliferación de las células T (Werb et al., 1978; Cupps & Fauci, 1982; Munck & Guyre, 1991; Wieggers et al., 1993), y hasta cierto punto de las células B (Roess et al., 1982; Cupps et al., 1985), se investigó la posible abolición de los efectos inmunosupresivos del tratamiento icv con CRH mediante la adrenalectomía. La adrenalectomía previa previno completamente los efectos del tratamiento icv con CRH sobre la proliferación de células T inducida por Con A o de linfocitos B por LPS. De este modo, los corticosteroides y/o las catecolaminas secretadas por la glándula adrenal parecen jugar un rol esencial en los efectos del tratamiento central con CRH sobre la mitogénesis de las células T y B esplénicas.

En los animales infundidos con CRH, mientras que en el día 7 de la infusión altos niveles de ambas hormonas se acompañan de una supresión en la proliferación, en el día 1 después del período de infusión, relativamente bajos niveles hormonales se observan en paralelo con un aumento dramático de los niveles de proliferación de los esplenocitos. Así, cambios agudos en la liberación de ACTH y de corticosterona, se ven acompañados por una reversión brusca de la actividad funcional de los linfocitos T, pasando de una respuesta proliferativa prácticamente suprimida a un marcado aumento de la misma. Dicha reversión en la respuesta proliferativa, observada en los esplenocitos provenientes de ratas sacrificadas en el día 7 de la infusión comparado con los obtenidos en el día 1 después de terminada la misma, indicaría que los efectos inhibitorios de los glucocorticoides sobre la proliferación linfocitaria no son de larga duración. Un fenómeno similar, donde los efectos de los glucocorticoides tienen lugar sólo por un período corto de tiempo fue descrito por Brezinschek et

al. (1993) en la cepa de pollos UCD-200, los cuales desarrollan la enfermedad fibrosa inflamatoria autoinmune. En este modelo se describió una relación inversa entre los glucocorticoides y los niveles de IL-2 luego de un desafío antigénico. En la cepa de pollos UCD-200, se detectó un decrecimiento del 80% en los niveles de IL-2 y en la respuesta proliferativa de células mononucleares periféricas al mitógeno Con A, en paralelo con niveles altos de corticosterona en el suero, a las 4 horas del desafío antigénico. Contrastando, a las 24 horas luego de la inyección con el antígeno se observó un aumento significativo en los niveles de IL-2 (Brezinschek et al., 1993).

Besedovsky y del Rey (1992) proponen como modelo a los sistemas neuro-endócrino e inmune funcionando dentro de una red, cuya actividad estaría influenciada por estímulos que actúan sobre ella o que son generados por alguno de sus componentes. Todos los elementos de esta red están informados sobre el estado funcional de los distintos elementos que componen la misma, mediante un mecanismo de control interactivo (Besedovsky & del Rey, 1992). Así, en los experimentos presentes, la corticosterona y la ACTH *in vivo*, podrían actuar como dichos elementos regulatorios, los cuales deben estar estrictamente controlados para una respuesta inmune óptima.

Bajas dosis de corticosterona, la cual ocupa relativamente pocos RG, pero activa extensivamente a los RM, lleva a una activación marcada de la respuesta inmune (Wiegiers et al., 1993). Altos niveles de corticosterona tanto *in vivo* como *in vitro*, suprimen la mitogénesis de las células T, vía RG. Estos efectos opuestos de corticosterona enfatizan un rol regulatorio bimodal de esta hormona en la regulación inmune, la cual podría estar mediada por diferentes receptores de corticosteroides (Wiegiers et al., 1993). Bajo condiciones de alteraciones en la funcionalidad del eje HPA, han sido observados cambios en los niveles de GR y MR en el cerebro, en el bazo y en otros órganos. Estos cambios ocurren durante estrés, envejecimiento y en otras manipulaciones de animales (De Kloet, 1991; Rothuizen et al., 1993). En estudios clínicos, alteraciones en el eje HPA fueron observadas durante la enfermedad de Cushing y en patologías asociadas a desórdenes mentales (Holsboer, 1990; Checkley, 1992). La respuesta inmune observada en estos desórdenes (Gillis et al., 1981; Keller et al., 1991; Sauer et al., 1994) podría estar modulada por variaciones funcionales en los RM y GR en las células del sistema inmune. En el presente trabajo, los niveles relativamente bajos de corticosterona en el día 1 después del período de infusión, podrían llevar a una reducida ocupación y activación del RG, y como consecuencia se observa una liberación de sus efectos supresivos sobre la proliferación. De este

modo, se observa la presencia de células T hiperreactivas a través de una respuesta proliferativa elevada. En el día 2 después de terminada la infusión, la proliferación de las células T provenientes de las ratas infundidas con la CRH o con el vehículo fue similar. Sin embargo, en el día 2 post-bombeo los niveles circulantes de corticosterona son comparables a los detectados en el día 1 post-bombeo, mientras que los de ACTH son semejantes a los medidos en el día 7 del período de infusión. Estos datos sugieren que la respuesta proliferativa, al menos en el día 2 post-bombeo, no depende solamente de los niveles de corticosterona circulantes. Luego de 7 días de terminada la infusión, los niveles proliferativos de los esplenocitos de las ratas CRH y de las tratadas con el vehículo fueron semejantes.

El estudio del rol de la ausencia corta de los productos derivados de la glándula adrenal en los efectos producidos por el tratamiento central con la hormona CRH, mediante la adrenalectomía bilateral de las ratas un día antes de la finalización de la infusión (= día 6), muestra que la ausencia por 24 horas de corticosterona no alcanza para la reversión pero sí previene la supresión de la respuesta proliferativa observada en el día 7 de infusión icv con CRH. Dichos resultados sugieren que el aumento en la proliferación observada en los esplenocitos estimulados por Con A en el día 1 post-bombeo, no es exclusivamente dependiente del cambio agudo en los niveles de corticosterona o que dicha hormona y/u otros productos de la glándula adrenal juegan un rol permisivo en dicha proliferación. Así como en los animales adrenalectomizados al comienzo del tratamiento con la CRH, en los adrenalectomizados 24 horas antes de terminada la infusión, se produce la reversión de la supresión observada en la proliferación de los esplenocitos provenientes de ratas infundidas por 7 días con CRH. O sea se confirma que los productos de la glándula adrenal juegan un rol esencial en la supresión de la proliferación ejercida por la infusión de la hormona CRH.

Ha sido reportado que, además de factores humorales, la función inmune esplénica está también regulada por el sistema nervioso simpático (Felten & Felten, 1991). Se ha demostrado que, la administración central aguda de CRH inhibe la actividad NK (Irwin et al., 1987; Irwin et al., 1988; Irwin et al., 1990a; Irwin et al., 1992). Dicho efecto pareció ser el resultado de un aumento en la actividad del sistema nervioso simpático inducida por la CRH, ya que fue revertido por bloqueo del ganglio simpático o por simpatomectomía (denervación noradrenérgica) del bazo (Irwin et al., 1988; Irwin et al., 1990a). El núcleo central de la amígdala, como parte del sistema límbico involucrado en la

regulación del sistema autonómico y conteniendo altas concentraciones del CRHR, podría ser el sitio neuroanatómico principal, por el cual la CRH central ejerce sus efectos neuroinmunológicos (Hauger et al., 1993). Sin embargo, la reversión completa de la inhibición de la proliferación de esplenocitos causada por la infusión central de CRH, mediante la adrenalectomía previa, provee evidencias de que el tratamiento prolongado *in vivo* con CRH afecta la función de las células B y T mediante un mecanismo diferente: la proliferación de los linfocitos T y B parece ser inhibida solamente por factores humorales, por ej. glucocorticoides, secretados por la glándula adrenal. Sin embargo, el sistema nervioso simpático podría regular la actividad inmune después del período de infusión central con CRH, donde no sólo la corticosterona plasmática participa de la regulación de la respuesta proliferativa de los esplenocitos. Por otra parte, un rol inmunomodulatorio ejercido por hormonas secretadas por la hipófisis, como por ej. ACTH, no puede ser excluído ya que este péptido ejerce directa e indirectamente, por la inducción de corticosteroides (Munck et al., 1984) o a través de la transformación secundaria a MSH (Smith et al., 1992), diversos efectos sobre la función inmune (Smith, 1994). Así, existen diversos mecanismos por los cuales el sistema neuroendócrino efectúa su regulación sobre mecanismos inmunes celulares.

### **5.3.2. Producción de IL-2 y del IL-2R $\alpha$ *in vitro***

Muchos reportes demuestran el requerimiento crítico de la producción de IL-2 y de la inducción del IL-2R para la proliferación de las células T (Smith, 1988). En este estudio, la proliferación de las células T fue enteramente dependiente de la vía de la IL-2, ya que la inclusión del anticuerpo anti-receptor de IL-2 en los cultivos de los esplenocitos de rata tratadas con el vehículo o con CRH, bloqueó completamente la mitogénesis inducida por el mitógeno Con A. En el día 7 del período de infusión, se observó que la estimulación *in vitro* por Con A de cultivos de esplenocitos de ratas tratadas *in vivo* con CRH, lleva a una reducción significativa de la proliferación de las células T, junto con un aumento en los niveles de la IL-2 y la disminución de la expresión tanto del ARNm de IL-2R $\alpha$  como de su proteína. Así, en los cultivos de esplenocitos, la proliferación de las células T es suprimida por el tratamiento con el péptido a través de una inhibición en la expresión del ARNm del IL-2R  $\alpha$  y consecuentemente de su proteína, mientras que la IL-2 no parecería ser el factor limitante para los bajos niveles proliferativos encontrados. La reducción substancial de la expresión de IL-2R $\alpha$ , en las células T estimuladas por Con A provenientes de las ratas

tratadas icv con CRH, podría ser el resultado de la exposición prolongada a altas concentraciones de corticosterona *in vivo*, ya que los glucocorticoides inducen una supresión en la acumulación del IL-2R $\alpha$ , y de la expresión de las formas tanto de alta, como de baja afinidad del IL-2R *in vitro* (Grabstein et al., 1986). Por otro lado, *in vitro*, los glucocorticoides, inhiben la expresión del gen de la IL-2 tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Gillis et al., 1979b; Vacca et al., 1992). El porqué de los niveles elevados de la IL-2 no se encuentra aún claro, pudiendo ser debidos a un aumento en la síntesis de la IL-2 y/o en la acumulación de este factor de crecimiento, debido a su bajo consumo o internalización (como resultado de la disminución de la expresión del IL-2R de alta afinidad, y de la reducción de la incorporación de timidina tritiada por dichas células T).

El efecto del tratamiento icv con CRH sobre la IL-2 fue dependiente de los factores secretados por la glándula adrenal ya que la adrenalectomía realizada en el momento en que comenzó la infusión, abolió el efecto del tratamiento con la CRH sobre los niveles de IL-2. Uno de los posibles mediadores de los efectos del tratamiento icv con CRH sobre la producción de IL-2 *in vitro*, podría ser la DHEA, la cual es producida por la glándula adrenal en respuesta a la estimulación por ACTH (Pang et al., 1987). En ratones ha sido reportada de aumentar la síntesis de IL-2 por células T murinas estimuladas, tanto luego de un tratamiento *in vivo*, como cuando es agregada directamente *in vitro* a los cultivos (Daynes et al., 1990). El tratamiento continuo con la hormona CRH no afecta las subpoblaciones de células T, como fue demostrado mediante el análisis por inmunofluorescencia, por lo tanto quedaría descartada la posibilidad de un aumento en los niveles de IL-2 debido a un aumento en la subpoblación CD4<sup>+</sup> (linfocitos secretores de IL-2). Por otra parte, sin estar entendido aún el mecanismo que lleva a las altas concentraciones de IL-2, la hipersecreción de dicha citoquina por las células T, podría tener implicaciones patofisiológicas ya que la misma está involucrada en el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Trotter et al., 1988; Wick et al., 1992; Heath et al., 1992; Wick et al., 1993).

En las ratas tratadas crónicamente con CRH, en el día 1 después del período de infusión se observaron altos niveles proliferativos, indicando una reversión en la proliferación comparada con la observada en el día 7 de la infusión. Sin embargo, en el día 1 post-bombeo, los niveles de IL-2 en los sobrenadantes de esplenocitos estimulados con Con A proveniente de ratas tratadas con el vehículo o con CRH, fueron semejantes. Probablemente una alta tasa de consumo o internalización de la IL-2 debido a la gran proliferación de las

células T podría explicar los niveles similares de esta citoquina en las ratas tratadas con el vehículo o con la CRH, en el día 1 post-bombeo. Además, en las ratas tratadas con CRH, se observó una mayor expresión del ARNm del IL-2R $\alpha$  comparada con la detectada en los animales infundidos con el vehículo, sólo cuando los esplenocitos fueron cultivados *in vitro* con una concentración de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de Con A. Este aumento en el ARNm del IL-2R $\alpha$  podría ser clave en la alta respuesta proliferativa observada en el día 1 después del período de infusión. La ausencia de una mayor inducción en el ARNm de la IL-2R $\alpha$  en los linfocitos de los animales que recibieron la infusión de CRH, cuando los esplenocitos fueron cultivados en presencia de una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  de Con A, podría deberse a que la expresión del mensajero del receptor se hace máxima cuando se utiliza la concentración de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de Con A. En el día 1 después del período de infusión con CRH, los valores mostrados por el análisis semicuantitativo del contenido del ARNm del IL-2R $\alpha$  no varían al aumentar la concentración del mitógeno. Por el contrario, en los animales tratados con el vehículo, se observó un incremento en el ARNm del IL-2R $\alpha$  cuando la dosis de Con A aumentó de 0,5 a 1  $\mu\text{g/ml}$ . Los niveles del ARNm del IL-2R $\alpha$  son similares para ambos grupos cuando los esplenocitos fueron estimulados con 1  $\mu\text{g/ml}$  de Con A. Así, el sistema alcanzó la expresión máxima del ARNm del IL-2R $\alpha$  en la concentración de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de Con A, en las ratas infundidas con CRH. Sorprendentemente, no se encontró ninguna diferencia en la expresión de la proteína del IL-2R $\alpha$  sobre las células CD4 $^{+}$  o TcR $\alpha\beta^{+}$  estimuladas con 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de Con A, entre las ratas tratadas con CRH y las infundidas con el vehículo. Este fenómeno podría deberse a un alto uso del IL-2R $\alpha$ , encontrándose, así, solamente diferencias a nivel de la transcripción. Sayar et al. (1990) demuestran que la expresión del IL-2R en linfocitos involucra una rápida tasa de recambio de la subunidad  $\alpha$  del mismo. Este podría también ser otro de los mecanismos que explicaría la falta de mayores niveles del IL-2R $\alpha$  a nivel proteico en los cultivos de esplenocitos estimulados por Con A 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , en las ratas tratadas con CRH. Así, en las ratas infundidas icv en forma crónica con CRH, tanto en el día 7 de la infusión como 1 día después de transcurrida la misma, los niveles del IL-2R $\alpha$  y no de la IL-2 parecerían ser una pieza clave en la proliferación de los esplenocitos. Un rol similar del IL-2R $\alpha$  sobre la proliferación linfocitaria fue recientemente también descrito por Wieggers et al. (1995). En dicho trabajo esplenocitos de ratas son estimulados *in vitro* con Con A o con un anticuerpo anti el TcR. La producción de IL-2 fue inhibida por los glucocorticoides a lo largo de todo el período de cultivo celular mientras que la expresión del receptor se encontró

aumentada, con un incremento paralelo en la proliferación celular (Wieggers et al., 1995).

En los días 2 y 7 post-bombeo, los niveles de la IL-2 medidos en los cultivos de los esplenocitos estimulados por Con A, son similares en las ratas tratadas con CRH y en las infundidas con el vehículo. En estos animales, a su vez, no fueron detectadas diferencias significativas en cuanto a los niveles proliferativos. Aunque los niveles de corticosterona y de ACTH se encuentran aún elevados en las ratas tratadas con la CRH, la proliferación y la producción de IL-2 muestran niveles similares a los encontrados en los vehículos. De este modo, los parámetros inmunes medidos parecerían normalizarse a partir del día 2 después del período de infusión, mientras que el eje HPA continúa alterado.

### 5.3.3. Expresión del ARNm de IL-1 $\beta$

La IL-1 juega un rol crítico durante la proliferación de las células T luego de una activación antigénica específica, como inductor de la secreción de IL-2 y de la expresión del receptor de alta afinidad de la IL-2 (Mizel, 1982). Por otro lado, la IL-1 actúa como mediador de procesos inflamatorios (Dinarello & Wolff, 1993). Los glucocorticoides son potentes inhibidores de la respuesta inflamatoria a través de su acción supresiva sobre la síntesis de una variedad de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y de otros mediadores (Beutler et al., 1986; Lee et al., 1988; Munck & Guyre, 1991). Sin embargo, en este estudio, a pesar del estado hipercortisolémico prolongado en las ratas infundidas con CRH *icv*, fue observado un marcado aumento en la expresión de la IL-1 $\beta$  en los esplenocitos provenientes de dichos animales. Se encontró el aumento en el contenido del ARNm de la IL-1 $\beta$  en esplenocitos aislados directa e inmediatamente luego de remover el bazo de los animales tratados con la hormona, excluyendo, de este modo, cambios en la expresión de la IL-1 debido a condiciones de cultivo *in vitro*. En esplenocitos o macrófagos luego de una estimulación por LPS *in vitro*, también se observó una mayor expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$ . Así, los macrófagos de las ratas tratadas con CRH muestran una expresión constitutiva aumentada del ARNm de la IL-1 $\beta$ , y un incremento en la producción de dicha interleuquina cuando son estimulados con LPS *in vitro*. Como ya fue descripto, los glucocorticoides inhiben la expresión del gen de la IL-1 directamente a nivel de la transcripción, de la estabilidad del ARNm, de la traducción y de la secreción (Snyder & Unanue, 1982; Knudsen et al., 1987; Lee et al., 1988; Lew et al., 1988), como indirectamente mediante la inducción de la IL-4 (Daynes &



Araneo, 1989; Wong et al., 1993). Se observó, que el aumento en la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$  en esplenocitos de ratas infundidas con CRH fue abolido por la adrenalectomía, indicando fuertemente que los glucocorticoides y/o las catecolaminas originadas en la glándula adrenal son piezas claves en los efectos estimulatorios de la administración central de CRH sobre la expresión del gen de la IL-1 $\beta$ .

En el día 1 después del período de infusión con CRH, la expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  sigue aumentada en esplenocitos obtenidos directamente del bazo de los animales. Este dato indica que la expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  no responde en forma aguda a los cambios hormonales observados en el día 1 post-bombeo. Sin embargo, 7 días luego de haber concluído el tratamiento con el péptido no se detecta un aumento en la expresión del gen de la IL-1 $\beta$  en las ratas tratadas con CRH.

Hasta el momento no queda claro si el aumento en la expresión del gen de la IL-1 $\beta$  en macrófagos esplénicos, debe ser tomando como un fenómeno de respuesta adaptativa (positiva) para contrarrestar una respuesta inmune específica dirigida por un antígeno, o como una respuesta con potenciales consecuencias perjudiciales. Esta ambigüedad proviene, por un lado, de la existencia de observaciones sobre las propiedades protectoras ejercidas por la IL-1, como por ejemplo, proteger a las células de la médula ósea de la muerte inducida por radiaciones (Neta et al., 1988), reducir la mortalidad causada por infecciones bacterianas o fúngicas (Van der Meer et al., 1988), reducir la hipotensión causada por endotoxinas (Kaplan et al., 1993). Por otro lado, la IL-1 contribuye con muchos de los cambios patológicos y fisiológicos asociados con los fenómenos de inflamación y sepsis (Dinarello, 1991; Dinarello & Wolff, 1993), y de este modo una hipersecreción de esta citoquina podría ser dañina para el organismo. Debido a las propiedades pleiotrópicas de la IL-1 (Dinarello, 1991; Dinarello & Wolff, 1993), y hasta cierto punto de la IL-2 (Robb, 1984; Karanth & McCann, 1991; Pontzer et al., 1992; Arzt et al., 1993), la hipersecreción de estas interleuquinas luego de un desafío inmune, podría precipitar cambios (pato)-fisiológicos en distintas partes del organismo, como en el cerebro y en órganos endócrinos. La importancia del control en la secreción de citoquinas, entre ellas IL-1 e IL-2, se evidencia en sus efectos biológicos, sumamente potentes, en parte señalados anteriormente (Arai et al., 1990; Hansson, 1990; Whicher & Evans, 1990). Por ello, no es sorprendente que sus actividades estén estrictamente reguladas. En condiciones basales o bajo un estímulo, la producción de citoquinas por las células del sistema inmune está balanceada. Las

citoquinas son sintetizadas sólo cuando son necesarias (Bendtzen, 1988; Dinarello, 1989; Whicher & Evans, 1990; Akira et al., 1990). En el presente trabajo, estos mecanismos regulatorios altamente controlados, entre ellos a través de la ACTH y la corticosterona, están alterados y en consecuencia ciertas citoquinas son producidas en grandes cantidades. La alteración en la regulación de las citoquinas puede dar lugar al crecimiento de células malignas vía mecanismos autócrinos o parácrinos, o llevar a alteraciones clínicas y histopatológicas características (Ford et al., 1982; Merz et al., 1991). El esclarecimiento del modo de acción de los glucocorticoides como reguladores de la respuesta inmune podría ser de suma importancia para su uso en la clínica. La potencial relevancia clínica de los glucocorticoides sobre la función inmune, se encuentra marcada por la observación que reducciones en la secreción de glucocorticoides luego de una adrenalectomía unilateral en pacientes con síndrome de Cushing por la presencia de adenomas adrenales, puede inducir el desarrollo de la enfermedad tiroidea autoinmune (Takasu et al., 1990). Este hecho indica la influencia protectora de los glucocorticoides contra el desarrollo de enfermedades autoinmunes en individuos normales. En estos pacientes, los altos niveles de los glucocorticoides a causa del adenoma adrenal podrían provocar cambios en el sistema inmune probablemente comparables con los cambios observados en los animales utilizados en el presente trabajo durante el período de infusión con la hormona CRH. Así como en los pacientes con el síndrome de Cushing, donde la adrenalectomía induce procesos autoinmunes; en las ratas tratadas con CRH, los niveles de glucocorticoides bajan abruptamente en el día 1 post-bombeo obteniéndose en paralelo células T hiperreactivas, y altos niveles de IL-1 $\beta$ . Si estas características son suficientes para el desarrollo de enfermedades autoinmunes en las ratas con infusión crónica icv de CRH queda por ser estudiado. Un desafío antigénico en este modelo podría proveer mayor información sobre los mecanismos implicados en dichos procesos autoinmunes.

Como fue ya indicado en la introducción, la EAE es una enfermedad autoinmune, inflamatoria, la cual puede causar en algunos casos demielinización en el SNC. La misma ocurre como consecuencia de la inmunización en animales con tejido del SNC heterólogo u homólogo, proteína básica miélica, o con ciertas secuencias polipeptídicas de dicha proteína. La artritis por administración de pared de células de estreptococos, es una enfermedad inflamatoria autoinmune inducida experimentalmente. Una inyección ip de fragmentos de pared de células de estreptococos en ratas hembra de la cepa Lew/N, produce una artritis severa aguda seguida por una artritis crónica erosiva. En contraste

---

con las ratas administradas con el vehículo, las ratas infundidas crónicamente con la hormona CRH, podrían ser vulnerables al desarrollo de EAE o de artritis inducida por pared de células de estreptococos especialmente luego del período de infusión del péptido. Los siguientes argumentos apoyan dicha hipótesis:

a) Los linfocitos T son las células inflamatorias cruciales en EAE y artritis. La función de los mismos esta marcadamente alterada en el presente modelo animal, tanto durante como luego de la infusión central con CRH.

b) Las ratas hembras Lew/N son particularmente susceptibles a la adquisición de desórdenes autoinmunes. Esta susceptibilidad parecería estar relacionada con una respuesta defectiva disminuída del eje HPA a mediadores inflamatorios u otros mediadores del fenómeno de estrés. Por otro lado, la resistencia al desarrollo de artritis por parte de las ratas de la cepa Fisher 344, parece estar relacionada con una respuesta intacta del eje HPA a los mismos estímulos antes mencionados. Aunque las ratas infundidas por 7 días con CRH presentan un estado de hipercortisolemia durante el período de infusión del péptido, un día luego de terminado el mismo (1 día post-bombeo), el eje HPA de estos animales presenta una respuesta hormonal disminuída.

c) La respuesta defectiva de ACTH y de corticosterona a mediadores inmunes o del estrés y la susceptibilidad a contraer artritis experimental en las ratas Lew/N parece deberse a un defecto hipotalámico en la síntesis y en la secreción de la CRH endógena. En el modelo animal presentado en este trabajo, la infusión icv de CRH probablemente module la síntesis y secreción de la CRH endógena tanto durante como una vez transcurrido el período de infusión.

d) Las concentraciones elevadas de IL-1 y de IL-2 han sido implicadas en enfermedades autoinmunes. En el modelo presente se observan que tanto los macrófagos como los linfocitos T provenientes de las ratas tratadas con la hormona CRH expresan niveles elevados de ambas citoquinas, respectivamente, lo cual podría tener consecuencias patofisiológicas.

## **6. Conclusiones de la presente investigación**

- La infusión crónica icv de CRH produce alteraciones substanciales en la secreción de hormonas por el eje HPA, tanto durante el período de infusión como luego del mismo
- Cambios pronunciados en distintos parámetros físicos son observados en paralelo a cambios en los niveles hormonales circulantes
- La hiperactividad el eje HPA, como en el caso del estrés crónico, resulta en cambios diferenciales dentro del sistema inmune
- Después de finalizado el período de infusión con CRH, de modo similar, luego del período post-estrés, distintas funciones del sistema inmune continúan estando marcadamente afectadas
- Los glucocorticoides actuarían, en parte, como mediadores de esta interacción neuroinmune
- Cambios agudos en la hiperactividad del eje HPA afectan significativa y rápidamente a la activación linfocitaria
- De este modo, el aumento de la secreción de CRH afecta la función del sistema inmune, lo cual podría tener consecuencias patofisiológicas

Futuros estudios sobre la respuesta inmune, endócrina y autonómica de las ratas infundidas en forma crónica icv con CRH a un estímulo inmune, brindarán mayor información sobre el significado patofisiológico de los cambios en la actividad linfocitaria y en la expresión de citoquinas y sus receptores en estos animales.

## 7. Referencias

Abraham E. (1991). *Meth. Arch. Exp. Pathol.* **14**, 45-62.

Akahoshi T., Oppenheim J.J., Matsushima K. (1988). *J. Exp. Med.* **167**, 924-936.

Akira S., Hirano T., Taga T., Kishimoto T. (1990). *FASEB J.* **4**, 2860-2864.

Akiyoshi M., Shimizu Y., Saito M. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 1266-1279.

Almawi W.Y., Lipman M.L., Stevens A.C., Zanker B., Hadro E.T., Strom T.B. (1991). *J. Immunol.* **146**, 3523-3527.

Andreis P.G., Neri G., Belloni A.S., Mazzocchi G., Kasprzak A., Nussdorfer G.G. (1991). *Endocrinology* **129**, 53-57.

Arai K., Lee F., Miyama A., Miyatake S., Arai N., Yokota T. (1990). *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 783-799.

Arase K., York D.A., Shimizu H., Shargill N., Bray G.A. (1988). *Am. J. Physiol.* **255**, E255-E259.

Araujo D.M., Lapchak P.A., Collier B., Quirion R. (1989). *Brain Res.* **498**, 257-266.

Armanini D., Strasser T., Weber P.C. (1985). *Am. J. Physiol.* **248**, E388-E390.

Arriza J.L., Simerly R.-B., Swanson L.W., Evans R.M. (1988). *Neuron* **1**, 887-900.

Arriza J.L., Weinberger C., Cerelli G., Glaser T.M., Handelin B.L., Housman D.E., Evans R.M. (1987). *Science* **237**, 268-275.

Arya S.K., Wong-Staal F., Gallo R.C. (1984). *J. Immunol.* **133**, 273-276.

Arzt E., Buric R., Stelzer G., Stalla J., Sauer J., Renner U., Stalla G.K. (1993). *Endocrinology* **132**, 459-467.

- 
- Arzt E., Fernández-Castelo S., Finocchiaro L.M.E., Criscuolo M.E., Díaz A., Finkielman S., Nahmod V.E. (1988). *J. Clin. Immunol.* **8**, 513-519.
- Arzt E., Sauer J., Pollmächer T., Labeur M., Holsboer F., Reul J.M.H.M., Stalla G.K. (1994). *Endocrinology* **134**, 672-677.
- Arzt E., Stelzer G., Renner U., Lange M., Müller O.A., Stalla G.K. (1992). *J. Clin. Invest.* **90**, 1944-1951.
- Atkins E. (1960). *Physiol. Rev.* **40**, 580-646.
- Ban E., Miloan G.A., Prudhomme N., Fillion G., Haour F. (1991). *Neuroscience* **43**, 21-30.
- Banks W.A., Kastin A.J. (1992). *Int. J. Immunopharmacol.* **14**, 629-636.
- Banks W.A., Kastin A.J., Durham D.A. (1989). *Brain Res. Bull.* **23**, 433-437.
- Banks W.A., Kastin A.J., Ehrensing C.A. (1994). *J. Physiol.* **479**, 257-264.
- Barbany G., Friedman W.J., Persson H. (1991). *J. Neuroimmunol.* **32**, 97-104.
- Bateman A., Singh A., Kral T., Solomon S. (1989). *Endocrine Rev.* **10**, 92-112.
- Baybutt H.N., Holsboer F. (1990). *Endocrinology* **127**, 476-480.
- Bendtzen K. (1988). *Immunol. Lett.* **19**, 183-189.
- Berkenbosch F., van Oers J., del Rey A., Tilders F., Besedovsky H. (1987). *Science* **238**, 524-526.
- Bernardini R., Kamilaris T.C., Calogero A.E., Johnson E.O., Gomez M.T., Gold P.W., Chrousos G.P. (1990). *Endocrinology* **126**, 2876-2881.
- Bernton E.W., Beach J.E., Holaday J.W., Smallridge R.C., H.G. F. (1987). *Science* **238**, 652-654.
- Bertoglio J.H., Leroux E. (1988). *J. Immunol.* **141**, 1191-1196.

---

Besedovsky H., Del Rey A., Sorkin E., Dinarello C.A. (1986). *Science* **233**, 652-654.

Besedovsky H., Sorkin E., Felix D., Haas H. (1977). *Eur. J. Immunol.* **7**, 323:325.

Besedovsky H.O., del Rey A. (1992). *Front. Neuroendocrinol.* **13**, 61-94.

Besedovsky H.O., Del Rey A.E., Sorkin E., Da Prada M., Burri R., Honegger C. (1983). *Science* **221**, 564:565.

Besedovsky H.O., Sorkin E., Keller M., Muller J. (1975). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **150**, 466-470.

Bettens F., Kristensen F., Walker C., Schwulera U., Bonnard G.D., De Weck A.L. (1984). *J. Immunol.* **132**, 261-265.

Beutler B., Cerami A. (1988). *Endocr. Rev.* **9**, 57-66.

Beutler B., Krochin N., Milsark I.W., Luedke C., Cerami A. (1986). *Science* **232**, 977-980.

Bindoni M., Perciavalle V., Berretta S., Belluardo N., Diamanstein T. (1988). *Brain Research* **462**, 10-14.

Birnboim H.C. (1983). *Meth. Enzymol.* **100**, 243-255.

Bost K.L., Clarke B.L., Xu J., Kiyono H., McGhee J.R., Pascual D. (1990). *J. Immunol.* **145**, 4326-4331.

Boumpas D.T., Anastassiou E.D., Older S.A., Tsokos G.C., Nelson D.L., Balow J.E. (1991). *J. Clin. Invest.* **87**, 1739-1747.

Boyle M., Yamamoto G., Chen M., Rivier J., Vale W. (1988). *Cell Biol.* **85**, 5556-5560.

Bradley L.M., Mishell R.I. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3155-3159.

Breder C.D., Dinarello C.A., Saper C.B. (1988). *Science* **240**, 321-324.

- 
- Brezinschek H.P., Gruschwitz M., Sgonc R., Moormann S., Herold M., Gershwin M.E., Wick G. (1993). *J. Autoimmun.* **6**, 719-733.
- Bristulf J., Simoncsits A., Bartfai T. (1991). *Neurosci. Lett.* **128**, 173-176.
- Brooks K.H. (1990). *J. Mol. Cell. Immunol.* **4**, 327-337.
- Brown R., Li Z., Vriend C.Y., Nirula R., Janz L., Falk J., Nance D.M., Dyck D.G., Greenberg A.H. (1991). *Cell. Immunol.* **132**, 84-93.
- Brown S.L., Smith L.R., Blalock J.E. (1987). *J. Immunol.* **139**, 3181-3183.
- Cardoso E., Arzt E., Courogion M., Comini E., Andrada J. (1990). *Int. Arch. All. Appl. Immunol.* **93**, 263:266.
- Carlson S.L., Felten D.L., Livnat S., Felten S.Y. (1987). *Brain Behav. Immun.* **1**, 52:63.
- Checkley S. (1992). *Br. J. Psychiatry* **160**, 7-17.
- Chen F.M., Bilezikjian L.M., Perrin M.H., Rivier J., Vale W. (1986). *Brain Res.* **381**, 49-57.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987). *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Claman H.N. (1975). *J. Allergy Clin. Immunol.* **55**, 145-151.
- Clarke B.L., Bost K.L. (1989). *J. Immunol.* **143**, 464-469.
- Cohen I.R., Stavy L., Feldman M. (1970). *J. Exp. Med.* **132**, 1055-1070.
- Cohen J.J., Duke R.C. (1984). *J. Immunol.* **132**, 38-42.
- Cohen S.N., Chang A.C.Y., Hsu L. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2110-2114.
- Cox J.H., Ford W.L. (1982). *Cell. Immunol.* **66**, 407-422.



- 
- Cox W.I., Holbrook N.J., Grasso R.J., Specter S., Friedman H. (1982). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **171**, 146-150.
- Crabtree G.R., Munck A., Smith K.A. (1980). *J. Immunol.* **125**, 13-17.
- Culpepper Y.A., Lee F. (1985). *J. of Immunol.* **135**, 3191-3197.
- Cunningham E.T., De Souza E.B. (1993). *Immunol. Today* **14**, 171-176.
- Cunningham E.T., Wada E., Carter D.B., Tracey D.E., Battey J.F., De Souza E.B. (1991). *Endocrinology* **128**, 2666-2668.
- Cupps T.R., Fauci A.S. (1982). *Immunol. Rev.* **65**, 133-155.
- Cupps T.R., Gerrard T.L., Falkoff J.M., Whalen G., Fauci A.S. (1985). *J. Clin. Invest.* **75**, 754-761.
- D'Urso R., Falaschi G., Canfalone G., Carusi E., Proietti A., Barnaba V., Balsano F. (1991). *Progr. Neuroendocrinimmunol.* **4**, 20-25.
- Dallman M.F., Akana S.F., Cascio C.S., Darlington D.N., Jacobson L., Levin N. (1987). *Rec. Prog. Horm. Res.* **43**, 113.
- Daynes R.A., Araneo B.A. (1989). *Eur. J. Immunol.* **19**, 2319-2325.
- Daynes R.A., Dudley D.J., Araneo B.A. (1990). *Eur. J. Immunol.* **20**, 793-802.
- De Coeij D.C.E., Jezova D., Tilders F.J.H. (1992). *Brain Res.* **577**, 165-168.
- De Kloet E.R. (1991). *Front. Neuroendocrinol.* **12**, 95-164.
- De Kloet E.R., Oitzl M.S., Schöbitz B. (1994). *Psychoneuroendocrinology* **19**, 121-134.
- De Souza E.B., Insel T.R., Perrin M.H., Rivier J., Vale W.W. (1985). *J. Neurosci.* **5**, 3189-3203.

---

De Souza E.B., Webster E.L., Grigoriadis D.E., Tracey D.E. (1989). *Psychopharmacol. Bull.* **25**, 299-305.

Dejana E., Brevario F., Erroi A., Bussolini F., Mussoni L. (1987). *Blood* **69**, 695-699.

del Rey A., Besedovsky H.O., Sorkin E. (1984). *J. Immunol.* **133**, 572-575.

del Rey A.E., Besedovsky H.O., Sorkin E., Da Prada M., Arrenbrechts S. (1981). *Cell. Immunol.* **63**, 329:334.

Denicoff K.D., Durkin T.M., Lotze M.T., Quinlan P.E., Davis C.L., Listwak S.J., Rosenberg S.A., Rubinow D.R. (1989). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **69**, 402-410.

DeSouza E.B. (1989). En: "*Neuropeptides and stress*". Tache Y., Morley J.E., Brown M.R. (eds.). Springer. New York, 1-17.

Dinarello C.A. (1989). *Adv. Immunol.* **44**, 153.

Dinarello C.A. (1991). *Blood* **77**, 1627-1652.

Dinarello C.A., Wolff S.M. (1993). *N. Engl. J. Med.* **328**, 106-113.

Dohanics J., E. H.G., Verbalis J.G. (1991). *Endocrinology* **128**, 331.

Dracott B.N., Smith C.E.T. (1979). *Immunology* **38**, 429-435.

Dunn A.J., Berridge C.W. (1990). *Brain Res. Rev.* **15**, 71-100.

Edwards C.K., Yunker L.M., Lorence R.M., Dantzer R., Kelley K.W. (1991a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2274-2277.

Edwards C.K., Lorence R.M., Dunham D.M., Arkins S., Yunker L.M., Greager J.A., Walter R.J., Dantzer R., Kelley K.W. (1991b). *Endocrinology* **128**, 989-996.

Emilie D., Karray S., Crevon M.-C., Vazquez A., Galanaud P. (1987). *Eur. J. Immunol.* **17**, 791-795.

- 
- Exon J.H., Bussiere J.L., Williams J.R. (1990). *Brain Behav. Immun.* **4**, 118-128.
- Falkoff R.J.M., Butler J.L., Dinarello C.A., Fauci A.S. (1984). *J. Immunol.* **133**, 692-696.
- Farrar W.L., Kilian P.L., Ruff M.R., Hill J.M., Pert C.B. (1987). *J. Immunol.* **139**, 459-463.
- Fässler R., Schauenstein K., Krömer G., Schwarz S., Wick G. (1986). *J. Immunol.* **136**, 3657-3661.
- Fauci A.S., Dale D.C. (1974). *J. Clin. Invest.* **53**, 240-246.
- Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983). *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Felten S.Y., Felten D.L. (1991). En: "*Psychoneuroimmunology*". Ader R., Felten D.S., Cohen N. (eds.). Academic Press. San Diego, 27-69.
- Fernandez-Ruiz E., Rebollo A., Nieto M.A., Sanz E., Somoza C., Ramirez F., Lopez Rivas A., Silva A. (1989). *J. Immunol.* **143**, 4146-4151.
- Firestein G.S., Roeder W.D., Laxer J.A., Townsend K.S., Weaver C.T., Hom J.T., Linton J., Torbett B.E., Glasebrook A.L. (1989). *J. Immunol.* **143**, 518-525.
- Ford R.J., Metha S., Davis F. (1982). *Cancer Treat. Rep.* **66**, 633.
- Fuchs E., Flügge G. (1995). *Psychoneuroendocrinology* **20**, 33-51.
- Gaillard R.C., Turnill D., Sappino P., Muller A.F. (1990). *Endocrinology* **127**, 101-106.
- Gauldie J., Sauder D.N., McAdam K.P.W.J., Dinarello C.A. (1987). *Immunology* **60**, 203-207.
- Gehring U. (1980). *Mol. Cell Endocrinol.* **20**, 261-274.
- Gessani S., McCandless S., Baglioni C. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**, 7454-7457.

- 
- Gillies G., Lowry P. (1979). *Nature* **278**, 463-464.
- Gillis S., Baker P.E., Union N.A., Smith K.A. (1979a). *J. Exp. Med.* **149**, 1460-1476.
- Gillis S., Crabtree G.R., Smith K.A. (1979b). *J. Immunol.* **123**, 1624-1631.
- Gillis S., Crabtree G.R., Smith K.A. (1979c). *J. Immunol.* **123**, 1632-1637.
- Gillis S., Ferm M.M., Ou W., Smith K.A. (1978). *J. Immunol.* **120**, 2027-2032.
- Gillis S., Kozak R., Durante M., Weksler M.E. (1981). *J. Clin. Invest.* **67**, 937-942.
- Gillis S., Smith K.A., Watson J. (1980). *J. Immunol.* **124**, 1954-1962.
- Gisler R.H., Schenkel-Hulliger L. (1971). *Cell. Immunol.* **2**, 646-657.
- Giulian D., Baker T.J., Snih L.N., Lachman L.B. (1986). *J. Exp. Med.* **164**, 594-604.
- Grabstein K., Dower S., Gillis S., Urdal D., Larsen A. (1986). *J. Immunol.* **136**, 4503-4508.
- Green M.R., Maniatis T., Melton D.A. (1983). *Cell* **32**, 681.
- Grimm E.A., Mazumder A., Zhang H.Z., Rosenberg S.A. (1982). *J. Exp. Med.* **155**, 1823-1841.
- Gruol D.J., Ashby M.N., Campbell N.F., Bourgeois S. (1986). *J. Steroid Biochem.* **24**, 255-258.
- Gutierrez E.G., Banks W.A., Kastin A.J. (1993). *J. Neuroimmunol.* **47**, 169-176.
- Gwosdow A.R., O'Connell N.A., Spencer J.A., Kumar M.S.A., Agarwal R.K., Bode H.H., Abou-Samra A.B. (1992). *Am. J. Physiol.* **263**, E461-E466.
- Hagan P., Poole S., Bristow F. (1992). *Biochem. J.* **281**, 251-254.

- 
- Hansson M. (1990). *Leukocyte Res.* **14**, 705.
- Harbuz M.S., Lightman S.L. (1992). *J. Endocrinol.* **134**, 327-339.
- Harbuz M.S., Rees R.G., Eckland D., Jessop D.S., Brewerton D., Lightman S.L. (1992). *Endocrinology* **130**, 1394-1400.
- Harrison L.C., Campbell I.L. (1988). *Mol. Endocrinol.* **2**, 1151.
- Hashimoto K., Suemaru S., Takao T., Sugarwara M., Makino S., Ota S. (1988). *Regul. Peptides* **23**, 117-126.
- Hauger R., Irwin M.R., Lorang M., Aguilera G., Brown M.R. (1993). *Brain Res.* **616**, 283-292.
- Hauger R.L., Aguilera G. (1993). *Endocrinology* **133**, 1708-1714.
- Heath W.R., Allison J., Hoffman M.W., Schoenrich G., Haemmerling G., Arnold B., Miller J.F. (1992). *Nature* **359**, 547-549.
- Henny C.S., Kuribayashi K., Kern D.E., Gillis S. (1981). *Nature* **291**, 335-338.
- Hermus A.R.M.M., Sweep C.G.J. (1990). *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **37**, 867-871.
- Hochman P.S., Cudkowicz G. (1979). *J. Immunol.* **123**, 968-976.
- Holbrook N.J., Cox W.I., Horner H.C. (1983). *Cancer Res.* **43**, 4019-4025.
- Hollenberg S.M., Weinberger C., Ong E.S., Cerelli G., Oro A., Lebo R., Thompson E.B., Rosenfeld M.G., Evans R.M. (1985). *Nature* **318**, 635.
- Holsboer F. (1989). *Eur. Arch. Psychiatry Neurol. Sci.* **238**, 302-322.
- Holsboer F. (1990). En: "*Handbook of affective disorders*". Paykel (eds.). Churchill Livingstone. London, 267-287.

---

Holsboer F., Stalla G.K., von Bardeleben U., Hammann K., Müller H., Müller O.A. (1988). *Life Sci.* **42**, 1-5.

Homo F., Duval D., Thierry C., Serrou B. (1979). *J. Steroid. Biochem.* **10**, 609-613.

Homo-Delarche F., Duval D. (1987). En: "*Hormones and immunity*". Berczi I., Kovacs K. (eds.). MTP Press. Lancaster, 1-19.

Hotta M., Shibasaki T., Yamauchi N., Ohno H., Benoit R., Ling N., Demura H. (1991). *Life Sci.* **48**, 1483-1491.

Irwin M., Hauger R., Brown M. (1992). *Endocrinology* **131**, 1047-1053.

Irwin M., Hauger R.L., Britton K.T. (1988). *Am. J. Physiol.* **255**, R744-R747.

Irwin M., Hauger R.L., Jones L., Provencio M., Britton K.T. (1990a). *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **255**, 101-107.

Irwin M., Vale W., Rivier C. (1990b). *Endocrinology* **126**, 2837-2844.

Irwin M.R., Vale W., Britto K. (1987). *Brain Behav Immun.* **1**, 81-87.

Jain R., Zwickler D., Hollander B., Hutchinson B., Brown C., Audhya T. (1991). *Endocrinology* **128**, 1329-1336.

Johnson H.M., Smith E.M., Torres B.A., Blalock J.E. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4171-4174.

Johnson H.M., Torres B.A., Smith E.M., Dion L.D., Blalock J.E. (1984). *J. Immunol.* **139**, 246-250.

Jones T.H., Justice S., Price A., Chapman K. (1991). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**, 207-209.

Kaplan E., Dinarello C.A., Wakabayashi G., Burke J.F., Conolly R.S., Gelfand J.A. (1993). *J. Infect. Dis.* **167**, 244-247.

- 
- Karalis K., Sano H., Redwine J., Listwak R., Wilder R.L., Chrousos G.P. (1991). *Science* **234**, 421-423.
- Karanth S., McCann S.M. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2961-2965.
- Katsuura G., Gottschall P.E., Dahl R.R., Arimura A. (1988). *Endocrinology* **122**, 1773-1779.
- Keller S.E., Schleifer S.J., Demetrikopoulos M.K. (1991). En: "*Psychoneuroimmunology*". Ader R., Felten D.L., Cohen N. (eds.). Academic Press. San Diego, 771-787.
- Keller-Wood M.E., Dallman M.F. (1984). *Endocrine Rev.* **5**, 1.
- Kelso A., Munck A. (1984). *J. Immunol.* **133**, 784-791.
- Kishi H., Inui S., Muraguchi A., Hirano T., Yamamura Y., Kishimoto T. (1985). *J. Immunol.* **134**, 3104-3107.
- Knudsen P.J., Dinarello C.A., Strom T.B. (1987). *J. Immunol.* **139**, 4129-4134.
- 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). *Endocrinology* **126**, 3053-3058.
- Koff W.C., Dunegan M.A. (1985). *J. Immunol.* **135**, 350-354.
- Krieger D.T. (1977). En: "*Endocrine Rhythms*". Krieger D.T. (ed.). Raven Press. New York, 123-135.
- Kroemer G., Brezinschek H.-P., Faessler R., Schauenstein K., Wick G. (1988). *Immunol. Today* **9**, 163-165.
- Krueger J.M. (1990). *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 126.
- Larsson E.L. (1980). *J. Immunol.* **124**, 2828-2833.
- Lee S.W., Tsou A.-P., Chan H., Thomas J., Petrie K., Eugui E.M. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1204-1208.

---

Leonard J.P., Harbuz M.S., Lightman S.L., Cuzner M.L. (1993). *J. Neuroimmunol.* **45**, 127-132.

Lew W., Oppenheim J.J., Matsushima K. (1988). *J. Immunol.* **140**, 1895-1902.

Licino J., Wong M.-L., Gold P.W. (1991). *Endocrinology* **129**, 562-564.

Liebermann A.P., Pitha P.M., Shin H.S., Shin M.L. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6348-6352.

Lippman M., Barr R. (1977). *J. Immunol.* **118**, 1977-1981.

Lotze M.T., Frana L.W., Sharrow S.O., Robb R.J., Rosenberg S.A. (1985). *J. Immunol.* **134**, 157-166.

Luber-Narod J., Rogers J. (1988). *Neurosci. Lett.* **94**, 17-22.

MacPhee I.A.M., Antoni F.A., Mason D.W. (1989). *J. Exp. Med.* **169**, 431-445.

Madden K.S., Felten D.L. (1995). *Physiol. Rev.* **75**, 77-106.

Mandel M., Higa A. (1970). *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1989). *"Molecular cloning: a laboratory manual"*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Mauel J., Rudolf H., Chapuis B., Brunner K.T. (1970). *Immunology* **18**, 517-535.

Mazumder A., Rosenberg S.A. (1984). *J. Exp. Med.* **159**, 495-507.

Mc Master G.K., Carmichael C.G. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4835.

McCann S.M., Rettori V., Milenkovic L., Jurcovicova J., Gonzalez M.C. (1990). *Adv. Exp. Med. Biol.* **274**, 315-329.

McGillis J.P., Park A., Rubin-Fletcher P., Turck C., Dallmann M.F., Payan D.G. (1989). *J. Neurosci. Res.* **23**, 346-352.



- 
- Mengheri E., Vignolini F., Gaetani S. (1995). *Nutr. Res.* **15**, 505-515.
- Merrill J.E. (1987). *Immunol. Today* **8**, 146-150.
- Merrill J.E. (1990). *Ann. New York Acad. Sci.* **594**, 188-199.
- Merz H., Houssiau F.A., Orscheschek K. (1991). *Blood* **78**, 1311.
- Mier J.W., Gallo R.C. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6134-6138.
- Milenkovic L., Rettori V., Snyder G.D., Beutler B., McCann S.M. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2418-2422.
- Miller A.H., Spencer R.L., Trestman R.L., Kim C., McEwen B.S. Stein, M. (1991). *Am. J. Physiology* **261**, E126-131.
- Mizel S.B. (1982). *Immunol. Rev.* **63**, 51-72.
- Mond J.J., Thompson C.T., Finkelman F.D., Farrar J., Schaefer M., Robb R.J. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1518-1521.
- Monjan A.A., Collector M.I. (1977). *Science* **196**, 307-308.
- Morrison D.A. (1979). *Meth. Enzymol.* **68**, 326-331.
- Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. (1986). *J. Immunol.* **136**, 2348-2357.
- Mosmann T.R., Coffman R.L. (1989). *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 145-173.
- Munck A., Crabtree G.R. (1981). En: "*Cell death in biology and pathology*". Bowen I.D., Lockshin R.A. (eds.). Chapman Hall. New York, 329-359.
- Munck A., Guyre P.M. (1991). En: "*Psychoneuroimmunology*". Ader R., Felten D.L., Cohen N. (eds.). Academic Press. San Diego, 447-474.
- Munck A., Guyre P.M., Holbrook N.J. (1984). *Endocrine Rev.* **5**, 25-44.

- 
- Munck A., Mendel D.B., Smith L.I., Ortí E. (1990). *Am. Rev. Resp. Dis.* **141**, S2-S10.
- Naito Y., Fukata J., Tominaga T., Masui Y., Hirai Y., Murakami N., Tamai S., Mori K., Imura H. (1989). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 1262-1267.
- Nakano K., Suzuki S., Chanh O., Yamashita K. (1986). *Acta Endocrinol.* **112**, 122-129.
- Naray A., Aranyi P., Quiroga V. (1980). *J. Steroid. Biochem.* **13**, 415-421.
- Navarra P., Tsagarakis S., Faria M.S., Rees L.H., Besser M., Grossman A.B. (1991). *Endocrinology* **128**, 37-44.
- Neifeld J.P., Lippman M.E., Tormey D.C. (1977). *J. Biol. Chem.* **252**, 2972-2977.
- Neta R., Oppenheim J.J., Douches S.D. (1988). *J. Immunol.* **140**, 108-111.
- Neta R., Perlstein R., Vogel S., Ledney D., Abrams J. (1992). *J. Exp. Med.* **175**, 689-694.
- Nijima A., Hori T., Aou S., Oomura Y. (1991). *J. Auton. Nerv. Syst.* **36**, 183:192.
- Nisticó G., De Sarro G. (1991). *Trends Neurosci. Res.* **14**, 146-150.
- Northrop J.P., Crabtree G.R., Mattila P.S. (1992). *J. Exp. Med.* **175**, 1235-1245.
- O'Connell N.A., Kumar A., Chatzipanteli K., Mohan A., Agarwal R.K., Head C., Bornstein S.R., Abou-Samra A.B., Gwosdow A.R. (1994). *Endocrinology* **135**, 460-467.
- Ohmichi M., Hirota K., Koike K., Kurachi H., Ohtsuka S., Matsuzaki N., Yamaguchi M., Miyake A., Tanizawa O. (1992). *Neuroendocrinology* **55**, 199-203.
- Okamoto Y., Minamoto S., Shimizu K., Mogami H., Taniguchi T. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6584-6588.
-

- 
- Orson F.M., Grayson J., Pike S., De Seau V., Blaese R.M. (1983). *J. Exp.Med.* **158**, 1473-1482.
- Ortaldo J.R., Mason A.T., Gerard J.P., Herderson L.E., Farrar W. (1984). *J. Immunol.* **133**, 779-783.
- Ovadia H., Abramsky O., Barak V., Conforti N., Saphier D., Weidenfeld J. (1989). *Exp. Brain Res.* **76**, 246-249.
- Page T.H., Dallman M.J. (1991). *Eur. J. Immunol.* **21**,2133-2138.
- Paliogianni F., Ahuja S.S., Balow J.P., Balow J.E., Boumpas D.T. (1993). *J. Immunol.* **151**, 4081-4089.
- Pang S.Y., Legido A., Levine L.S., Temeck J.W., New M.I. (1987). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **65**, 282-289.
- Pawlikowski M., Zelazowski P., Dohler K.D., Stepien H. (1988). *Brain Behav. Immun.* **2**, 50.
- Paxinos G., Watson C. (1986). *"The rat brain in stereotactiv coordinate"* . Academic Press. London.
- Plotsky P.M. (1985). *Fed. Proc.* **44**, 207.
- Pontzer C.H., Griggs N.D., Johnson H.M. (1992). *Adv. Neuroimmunol.* **2**, 17-31.
- Reul J.M.H.M., De Kloet E.R. (1985). *Endocrinology* **117**, 2505.
- Rivier C., Vale W. (1983). *Nature* **305**, 325-327.
- Robb R.J. (1984). *Immunol. Today* **5**, 203-209.
- Roberts J.L., Seeburg P.H., Shine J., Herbert E., Baxter, J.D., Goodman H.M. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2153-2157.
- Roess D.A., Bellone C.J., Ruh M.F., Nadel E.M., Ruh T.S. (1982). *Endocrinology* **110**, 169-175.

---

Rose-John S., Schooltink H., Lenz D., Hipp E., Dufhues G., Schmitz H., Schiel X., Hirano T., Kishimoto T., Heinrich P.C. (1990). *Eur. J. Biochem.* **190**, 79-83.

Rothuizen J., Reul J.M.H.M., Van Sluijs F.J., Mol J.A., Rijnberk A., De Kloet E.R. (1993). *Endocrinology* **132**, 161-168.

Rousseau G.G. (1984). *Mol. Cell Endocrinol.* **38**, 1-11.

Saneto R.P., Altman A., Knobler R.L., Johnson H.M., De Vellis J. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9221-9225.

Saperstein A., Brand H., Audhya T., Nabriski D., Hutchinson B., Rosenzweig S., Hollander C.S. (1992). *Endocrinology* **130**, 152-158.

Saphier D., Abramsky O., Mor G., Ovadia H. (1987). *Brain Behav. Immun.* **1**, 40-51.

Sapolsky R., Rivier C., Yamamoto G., Plotsky P., Vale W. (1987). *Science* **238**, 522-524.

Sauer J., Stalla G.K., Müller O.A., Arzt E. (1994). *Neuroendocrinology* **59**, 144-151.

Sayar D., Ketzinel M., Gerez L., Silberberg C., Reshef A., Kaempfer R. (1990). *J. Immunol.* **145**, 2946-2949.

Scaccianoce S., Muscolo L.A.A., Cigliana G., Navarra D., Nicolai R., Angelucci L. (1991). *Endocrinology* **128**, 3138-3143.

Schleimer R.P., Jacques A., Shin H.S., Lichtenstein L.M., Plaut M. (1984). *J. Immunol.* **132**, 266-271.

Schöbitz B., Voorhuis A.M., De Kloet E.R. (1992). *Neurosci. Lett.* **136**, 189-192.

Seris S.C. (1988). *J. Neurosurg.* **69**, 20-34.

Sharief M.K., Hentges R., Ciardi M., Thompson E.J. (1993). *J. of Neurology* **240**, 46-50.

- 
- Sharp B.M., Matta S.G., Peterson P.K., Newton R., Chao C., McAllen K. (1989). *Endocrinology* **124**, 3131-3133.
- Shaw J., Monticone V., Paetkau V. (1978). *J. Immunol.* **120**, 1967-1973.
- Shnetzler M., Oommen A., Nowak J.S., Franklin R.M. (1983). *Eur. J. Immunol.* **13**, 560-566.
- Singh V.K. (1989). *J. Neuroimmunol.* **23**, 257-262.
- Singh V.K., Fudenberg H.H. (1988). *Immunol. Lett.* **18**, 5-8.
- Singh V.K., Leu S.-J.C. (1990). *Neurosci. Lett.* **120**, 151-154.
- Singh V.K., Warren R.P., White E.D., Leu S.J.C. (1990). *Ann. NY Acad. Sci* **594**, 416-419.
- Smith E.M. (1994). En: "*Neuropeptides and Immunoregulation*". Scharrer B., Smith E.M., Stefano G.B. (eds.). Springer-Verlag. Berlin, 28-45.
- Smith E.M., Brosnan P., Meyer III W.J., Blalock J.E. (1987). *N. Engl. J. Med.* **12**, 1266-1269.
- Smith E.M., Hughes T.K., Hashemi F., Stefano G.B. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 782-786.
- Smith K.A. (1988). *Science* **240**, 1169-1176.
- Smith K.A., Crabtree G.R., Kennedy S.J., Munck A.U. (1977). *Nature* **267**, 523-525.
- Smith K.A., Lachman L.B., Oppenheim J.J., Favata M.F. (1980). *J. Exp. Med.* **151**, 1551-1561.
- Smith L.R., Brown S.L., Blalock J.E. (1989). *J. Neuroimmunol.* **21**, 249-254.
- Snyder D.S., Unanue E.R. (1982). *J. Immunol.* **129**, 1803-1805.

---

Snyers L., De Wit L., Content J. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2838-2842.

Soliven B., Albert J. (1992). *J. Neurochem.* **58**, 1073-1078.

Spangelo B.L., Isakson P.C., MacLeod R.M. (1990). *Endocrinology* **127**, 403-409.

Spangelo B.L., Judd A.M., Isakson P.C., MacLeod R.M. (1991). *Endocrinology* **128**, 2685-2692.

Spangelo B.L., Judd A.M., MacLeod R.M., Goodman D.W., Isakson P.C. (1990). *Endocrinology* **127**, 1779-1785.

Sternberg E.M., Hill J.M., Chrousos G.P., Kamilaris T., Listwak S.J., Gold P.W., Wilder R.L. (1989a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2374-2378.

Sternberg E.M., Young III W.S., Bernardini R., Calogero A.E., Chrousos G.P., Gold P.W., Wilder R.L. (1989b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4771-4775.

Street N.E., Schumacher J.H., Fong T.A.T., Bass H., Fiorentino D.F., Leverah J.A., Mosmann T.R. (1990). *J. Immunol.* **144**, 1629-1639.

Stumpf W.E., Sar M. (1979). En: *"Interaction within the brain-pituitary-adrenocortical system"*. Jones M.T., Gillham B., Dallman M.F., Chattopadhyay S. (eds.). Academic Press. London, 137.

Suda T., Tomor N., Tozawa P., Mouri T., Demura H., Shizume K. (1983). *Endocrinology* **113**, 182-184.

Sundar S.K., Becker K.J., Cierpeal M.A., Carpenter M.D., Rankin L.A., Fleener S.L., Ritchie J.C., Simson P.E., Weiss J.M. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6398-6402.

Sundar S.K., Cierpial M.A., Kits C., Ritchie J.C., Weiss J.M. (1990). *J. Neurosci.* **10**, 3701-3706.

---

Sutton R.E., Koob G.F., Moal M.L., Rivier J., Vale W. (1982). *Nature* **297**, 331-331.

Swanson L.W., Sawchenko P.E., Rivier J., Vale W.W. (1983). *Neuroendocrinology* **36**, 165.

Swanson L.W., Simmons D.M. (1989). *J. Comp. Neurol* **285**, 413.

Szamel M., Leufgen H., Kurrle R., Resch K. (1995). *Biochim. Biophys. Acta* **1235**, 33-42.

Tabor S., Richardson C.C. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1074.

Takasu N., Komiya I., Nagasawa Y., Asawa T., Yamada T. (1990). *N. Engl. J. Med.* **322**, 1708-1712.

Takeshita T., Asao H., Ohtani K., Ishii N., Kumaki S., Tanaka N., Munakata H., Nakamura M., Sugamura K. (1992). *Science* **257**, 379-382.

Taniguchi T., Yasuhiro M. (1993). *Cell* **73**, 5-8.

Tobler A., Meier R., Seitz M., Dewald B., Baggiolini M., Fey M.F. (1992). *Blood* **79**, 45-51.

Tominaga T., Fukata J., Naito Y., Usui T., Murakami N., Fukushima M., Nakai Y., Hirai Y., Imura H. (1991). *Endocrinology* **128**, 526-531.

Trotter J.L., Clifford D.B., Anderson C.B., Van Der Veen R.C., Hicks B.C., Banks G. (1988). *N. Engl. J. Med.* **318**, 1206.

Udelsman R., Harwood J.P., Millan M.A., Chrousos G.P., Goldstein D.S., Zimlichman R., Catt K.J., Aguilera G. (1986). *Nature* **319**, 147-150.

Vacca A., Felli M.P., Farina A.R., Martinotti S., Maroder M., Screpanti I., Meco D., Petrangeli E., Frati L., Gulino A. (1992). *J. Exp. Med.* **175**, 637-646.

---

Vale W., Vaughan J., Yamamoto G., Bruhn T., Douglas C., Dalton D., Rivier C., Rivier J. (1983). En: *"Methods in enzymology, hormone actions, neuroendocrine peptides"*. Conn P.M. (ed.). Academic Press. New York, 565-577.

Van der Meer J.W.M., Barza B., Wolff S.M., Dinarello C.A. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1620-1623.

Vankelecom H., Carmeliet P., Van Damme J., Billiau A., Deneef C. (1989). *Neuroendocrinology* **49**, 102-106.

Velasco S., Tarlow M., Olsen K., Shay J.W., McCracken jun. G.H., Nisen P.D. (1991). *J. Clin. Invest.* **87**, 1674-1680.

Velkeniers B., Vergani P., Trouillas J., D'Haens J., Hooghe R.J., Hooghe-Peters E.L. (1994). *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 67-76.

Vilcek J., Le J. (1994). En: *"The cytokine handbook"*. Thomson A.W. (ed.). Academic Press. Pittsburgh, 1-19.

Waguespack P.J., Banks W.A., Kastin A.J. (1994). *Brain Res. Bull.* **34**, 103-109.

Wang Y., Joncourt F., Kristensen F., De Weck A.L. (1984). *Int. J. Immunopharmacol.* **6**, 105-110.

Webster E.L., Tracey D.E., Jutila M.A., Wolfe S.E., De Souza E.B. (1990). *Endocrinology* **127**, 440-452.

Weigent D.A., Blalock J.E. (1987). *Immunol. Rev.* **100**, 79-108.

Weinfeld J., Abramsky O., Ovadia H. (1989). *Neuroendocrinology* **50**, 650-654.

Werb Z., Foley R., Munck A. (1978). *J. Exp. Med.* **147**, 1684-1694.

Whicher J.T., Evans S.W. (1990). *Clin. Chem.* **36**, 1269.

Whitnall M.H. (1988). *J Comp Neurol* **275**, 13.

Wick G., Hu Y., Schwarz S., Kroemer G. (1993). *Endocr. Rev.* **14**, 539-563.



- Wick G., Hu Y.-H., Gruber J. (1992). *Trends Endocrinol. Metab.* **3**, 141-146.
- Wiegiers G.J., Croiset G., Reul J.M.H.M., Holsboer F., De Kloet E.R. (1993). *Am. J. Physiol.* **265**, E825-E830.
- Wiegiers G.J., Labeur M.S., Stec I.E.M., Klinkert W.E.F., Holsboer F., Reul J.M.H.M. (1995). *J. Immunol.* **155**, 1893-1902.
- Wiegiers G.J., Reul J.M.H.M., Holsboer F., De Kloet E.R. (1994). *Endocrinology* **135**, 2351-2357.
- Woloski B.M.R.N.J., Smith E.M., III. M.W.J., Fuller G.M., Blalock J.E. (1985). *Science* **230**, 1035-1037.
- Wong H.L., Costa G.L., Lotze M.T., Wahl S.M. (1993). *J. Exp. Med.* **177**, 775-781.
- Wu C.Y., Fargeas C., Nakajima T., Delespesse G. (1991a). *Eur. J. Immunol.* **21**, 2645-2647.
- Wu C.Y., Safarti M., Heusser C., Fournier S., Rubio-Trujillo M., Peleman R., Delespesse G. (1991b). *J. Clin. Invest.* **87**, 870-877.
- Wynn P.C., Harwood J.P., Catt K.J., Aguilera G. (1988). *Endocrinology* **122**, 351-358.
- Wynn P.C., Hauger R.L., Holmes M.C., Millan M.A., Catt K.J., Aguilera G. (1984). *Peptides* **5**, 1077-1084.
- Zakarian S., Eleazar M.S., Silvers W.K. (1989). *Nature* **339**, 553-556.
- Zanker B., Walz G., Wieder K.J., Strom T.B. (1990). *Transplantation* **49**, 183-185.
- Zarling J.M., Bach F.H. (1979). *Nature* **280**, 685-688.
- Zurawski G., Benedik M., Kamb B.J., Abrams J.S., Zurawski S.M., Lee F.D. (1986). *Science* **232**, 772-775.

## 8. Publicaciones relacionadas con el tema

Partes de este trabajo dieron lugar a las siguientes publicaciones:

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**, 2678-2688.

Reul J.M.H.M., Labeur M.S., Wiegers G.J., Arzt E., Holsboer F. (1994). Immune and endocrine implications of long-term intracerebroventricular corticotropin-releasing hormone administration in the rat. 24° Reunión Anual de la "Society for Neuroscience", Miami Beach, Florida, EEUU, Noviembre 13-18.

Labeur M.S., Arzt E., Wiegers G.J., Holsboer F., Reul J.M.H.M. (1994). Effect of long-term intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing hormone on endocrine and immune function in the rat. 4° Congreso Internacional de Neuroinmunología, Amsterdam, Holanda, Octubre 23-27. (*J. Neuroimmunol.* **54**, 175).

Labeur M.S., Arzt E., Wiegers G.J., Holsboer F., Reul J.M.H.M. (1995). Chronic hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hyperactivity in the rat produces enhanced cytokine expression and reduced splenocyte activation. 3° Conferencia Anual de la "International Cytokine Society", Harrogate, Inglaterra, Septiembre 12-15. (*Cytokine* **7**, 623).



M. S. Labeur