



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS INDUCIDAS POR EL ESTRÉS. IMPORTANCIA EN LA  
FISIOPATOLOGÍA DE LA DEPRESIÓN**

**Autor: Dafne Magalí Silberman  
Director: Dra. Ana María Genaro  
Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Artz**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
Área: Ciencias Biológicas

Laboratorio de Psiconeuroinmunología  
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)  
CONICET

### “ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS INDUCIDAS POR EL ESTRÉS. IMPORTANCIA EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DEPRESIÓN”

El objetivo de este trabajo fue comprender las alteraciones inmunológicas inducidas por estrés y su asociación con trastornos que cursan con cambios conductuales.

Se utilizó un modelo de estrés crónico moderado (CMS) que consiste en la aplicación de factores estresores de manera crónica, secuencial e impredecible durante varias semanas.

Se observó el desarrollo de un estado anhedónico en animales expuestos a CMS, un aumento de la actividad locomotora y una disminución de su capacidad de aprendizaje y memoria, compatible con las alteraciones estructurales encontradas en el hipocampo.

La respuesta inmune en estos animales se vio alterada, encontrándose una disminución en la respuesta T-dependiente y un aumento de la reactividad de linfocitos B. Estas alteraciones se correlacionaron con cambios en las señales intracelulares implicadas en la activación celular.

Los niveles de hormonas del estrés (catecolaminas y corticosterona) no se hallaron aumentados en el momento de la aparición de la alteración inmunológica pero los linfocitos mostraron una alteración en la sensibilidad a su efecto.

Se encontraron niveles aumentados en la producción de IL-6 evidenciándose un desbalance Th1/Th2 en animales estresados. La administración periférica de esta interleuquina indujo cambios conductuales y alteraciones en el hipocampo similares a los observados en los animales CMS.

El estrés crónico induciría cambios inmunológicos que participarían en los cambios conductuales y estructurales que acompañan a patologías íntimamente asociadas al estrés como es la depresión.

Palabras Claves: Psiconeuroinmunología, Estrés crónico, Inmunidad, Señalización Intracelular, depresión.

### “IMMUNOLOGICAL ALTERATIONS INDUCED BY STRESS. IMPLICATIONS IN THE PHYSIOPATHOLOGY OF DEPRESIÓN”

The aim of this work was to understand the immunological alterations induced by stress and how these alterations could be associated to disorders related to behavioral changes.

A Chronic Mild Stress model (CMS) was used that consisted of the chronic, sequential and unpredictable exposure to stressors for several weeks.

An anhedonic-like state and the lost of body weight were observed in CMS-exposed animals. CMS animals showed an increment of the locomotor activity and an impairment of learning and memory which was in accordance with structural changes in the hippocampus.

Immune response of T and B cells was altered in CMS animals. Chronic stress affected T-dependent humoral response while had no effect over the T-independent response. These alterations were correlated with the corresponding intracellular signals.

Involvement of catecholamines and corticosterone in T and B cells immune response was also investigated. Although levels of both hormones were not augmented at the time the immune alteration appears, immune cells showed a greater sensitivity to their effect.

TH1/TH2 imbalance was analyzed and IL-6 production was found to be increased in lymphocytes from CMS-exposed mice. Peripheral chronic administration of this interleukine induced similar behavioural and hippocampal structural changes the CMS-exposed animals.

These data allow us to conclude the chronic stress may induce immunological alterations that would be involved in the behavioural and structural changes related to pathologies intimately associated to stress like depression.

**Key Words:** Psychoneuroimmunology, Chronic Stress, Immunity, Intracellular Signaling, Depression.

Los resultados presentados en esta tesis han sido parcialmente publicados en:

Protein Kinase C-dependent NF- $\kappa$ B activation is altered in T cell by chronic stress. Silberman DM., Zorrilla-Zubilete M, Cremaschi GA and Genaro AM. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005 62:1744-54.

Impaired T-cell dependent humoral response and its relationship with T lymphocyte sensitivity to stress hormones in a chronic mild stress model of depression. Silberman DM, Ayelli-Edgar V, Zorrilla-Zubilete M, Zieher L.M. and Genaro AM. Brain Behavior and Immunity, 2004, 18:81-90.

Altered lymphocyte catecholamine reactivity in mice subjected to chronic mild stress. Ayelli-Edgar V., Silberman M., Zieher L., Genaro A. M. Biochemical Pharmacology, 2003, 65:15-23.

Acute and chronic stress exert opposite effects on isotype switching associated with changes in stress hormone regulation of T lymphocyte reactivity. Silberman DM, Wald MR. and Genaro AM. Journal of Neuroimmunology, 2003, 144(1-2):53-60.

Effects of chronic mild stress on lymphocyte proliferative response. Participation of thyroid hormones and corticosterone. Silberman M, Wald M., Genaro A.M. International Immunopharmacology 2002;2:487-97.

## AGRADECIMIENTOS

---

A la Dra. Ana María Genaro, por enseñarme y dirigirme. Por darme un lugar y permitirme trabajar al lado suyo.

A Lauchi, la culpable de esta tesis. Por sus consejos, su fuerza, su voluntad, su incondicionalidad, su amistad.

A María, por dejarme literalmente su lugar. Por su buena onda, por bancarse mis quejas, por hacer que todo sea más fácil.

A la Dra. Graciela Cremaschi, por su apoyo y su buena predisposición, por estar siempre para dar una mano, por sus ganas incansables de hacer cosas.

A la Dra. Ana María Franchi, por su ayuda y sus consejos, por su convicción y su lucha constante.

A Maki, por doce años de amistad. Por su humor, por su ganas de ayudar, por estar siempre ahí.

A la toda gente del CEFYBO, por los almuerzos, los cumpleaños, las Primaveraes, por los años pasados en Serrano y los que vienen en Medicina.

A los chicos de Franchi: La Pipi, Juli, Claudita, Rami, Silvia, Maxi, por estar siempre para el mangazo, por los almuerzos y la buena onda.

A María Rosa, por su ayuda invaluable, por dividir su tiempo entre todos los que la necesitamos.

A la Dra. Miriam Wald, a María Laura y a Alicia, por acompañarme todos los días.

A Laurita y Andrés, por su compañía, por dejarme ser un poquito parte de sus carreras.

A Daniel González, por su indescriptible ayuda con el modelo de Estrés Crónico Moderado.

Al Dr. Lisardo Boscá y su grupo de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por abrirme las puertas de su laboratorio. A Nora y a Jime, por hacer que estar lejos no se sienta tanto.

Al Dr. Luis María Zieher, al Dr. Pedro Lipszyc y a la gente de la 1<sup>ra</sup> Cátedra de Farmacología, por recibirnos con los brazos abiertos y darnos un lugar para seguir trabajando.

Al Dr. Hugo Ríos, por su ayuda con las técnicas de tinción de cortes histológicos.

A la Dra. Claudia García Bonelli, por su ayuda con la técnica de HPLC.

A Lore, Marian, Nori y Cioquito, tan lejos y tan cerca, por estar siempre, por confirmar que las distancias se acortan con el cariño de tanto tiempo.

A Chinga, por los años de estudio, de fútbol y de Sanca.

A Cynthia, mi hermana, por su apoyo constante, por estar cada vez más cerca.

Al Ministerio de Salud de la Nación y al CONICET, por las becas que me permitieron realizar este trabajo.

*A mis viejos*

Ac, anticuerpo  
Ach, acetil colina  
AC, adenilato ciclasa  
ACTH, adrenocorticotrofina  
Ag, antígeno  
APC, células presentadora de antígeno  
AVP, arginina vasopresina  
BCR, receptor de linfocitos B  
Ca<sup>2+</sup>, Calcio  
cAMP, adenosin monofosfato cíclico  
CMS, estrés crónico moderado  
Con A, concanavalina A  
CQs, citoquinas  
CRF, factor liberador de corticotrofina  
DAG, diacilglicerol  
DNTPs, deoxi-nucleótidos tri-fosfato  
EMSA, Ensayo de movilidad electroforética  
ERK, quinasa extracelular regulada por señal  
GCs, glucocorticoides  
GCR, receptor de glucocorticoides  
GRC, glóbulo rojo de carnero  
GRE, elemento de respuesta a glucocorticoides  
HPA, eje hipofisario-pituitario-adrenal  
Ig, Inmunoglobulinas  
IFN, interferón  
IκB, inhibidor de NF kappa B  
IKKB, quinada del inhibidor de NF kappa B  
JUNK, JUN quinasa  
IL, interleuquina  
IP<sub>3</sub>, inositol-trifosfato  
IRSS, inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina  
LB, linfocitos B  
LPS, lipopolisacárido de membrana  
LT, linfocitos T  
MAPK, proteínas quinasas activadas por mitógeno  
Mφ, macrófagos

MHC, complejo mayor de histocompatibilidad  
MR, receptor de mineralocorticoides  
NA, noradrenalina  
NF- $\kappa$ B, factor de transcripción nuclear kappa B  
NK, células asesinas naturales  
PIP<sub>2</sub>, fosfatidil inositol 4,5-bifosfato  
PKA, proteína quinasa A  
PKC, proteína quinasa C  
PHA, fitohemoglutinina  
PLC, fosfolipasa  
PMA, forbol 12-miristato 13-acetato  
SE, sistema endocrino  
SFB, suero fetal bovino  
SI, sistema inmune  
SNA, Sistema Nervioso Autónomo  
SNE, Sistema Neuroendócrino  
SNC, sistema nervioso central  
SNS, Sistema Nervioso Simpático  
TCR, receptor de linfocitos T  
TH, T colaborador  
TLR4, receptor tipo Toll 4  
TNF, factor de necrosis tumoral  
TPK, proteína tirosina quinasa

## INTRODUCCIÓN

|  |    |
|--|----|
| 1- EL SISTEMA INMUNE   | 14 |
| 1-1 LA RESPUESTA INMUNE. TIPOS Y CÉLULAS EFECTORAS   | 14 |
| 1-2 SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR LT Y LB  | 18 |
| 1-3 FACTORES SOLUBLES. RESPUESTAS TIPO TH1 Y TH2   | 23 |
| 1-3-a CITOQUINAS   | 23 |
| 1-3-b RESPUESTAS TIPO TH1 Y TH2  | 24 |
| 2- REGULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE   | 26 |
| 2-1 REGULACIÓN DEL SI POR EL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO.  | 27 |
| 2-2 REGULACIÓN DEL SI POR EL EJE HIPOTALAMO-PITUITARIO-ADRENAL.  | 30 |
| 3- EFECTOS DEL SISTEMA INMUNE SOBRE LA ACTIVIDAD NEUROENDOCRINA.   | 33 |
| 4- INFLUENCIA DE LOS FACTORES PSICOLÓGICOS EN LA FUNCIONALIDAD DEL SISTEMA INMUNITARIO. EL ESTRÉS Y SUS CONSECUENCIAS. | 34 |
| 5- ESTRÉS Y DEPRESIÓN  | 35 |
| 6- CQS Y DEPRESIÓN   | 37 |
| 7- TIEMPOS MODERNOS  | 38 |
| 8- MODELOS ANIMALES DE DEPRESIÓN   | 38 |

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

|                        |    |
|------------------------|----|
| HIPÓTESIS DE TRABAJO   | 41 |
| OBJETIVOS GENERALES    | 42 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 42 |

## MATERIALES Y MÉTODOS

|   |    |
|---|----|
| 1- ANIMALES   | 44 |
| 2- MODELO DE ESTRÉS CRÓNICO MODERADO (CMS)                          | 44 |
| 2-1 MODELO ANIMAL DE ESTRÉS   | 44 |
| 2-2 TEST DE CONSUMO DE SACAROSA                                     | 44 |
| 2-3 DETERMINACIÓN DEL PESO CORPORAL                                 | 45 |
| 2-4 REVERSIÓN CON ANTIDEPRESIVOS                                    | 45 |
| 3- ESTUDIOS DEL COMPORTAMIENTO ANIMAL                               | 45 |
| 3-1 TEST DEL “CAMPO ABIERTO” (OPEN FIELD)                           | 45 |
| 3-3 TEST DE EVITACIÓN INHIBITORIA                                   | 46 |
| 4- EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN ESTRUCTURAS CEREBRALES | 47 |
| 4-1 HISTOLOGÍA DE LAS ZONAS CA1 Y CA3 DE HIPOCAMPO                  | 47 |
| 4-2 TINCIÓN CON EL COLORANTE DE HOESCHT                             | 47 |

|  |    |
|--|----|
| 5- EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE   | 48 |
| 5-1 OBTENCIÓN DE LINFOCITOS  | 48 |
| 5-2 DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR                                | 49 |
| 5-3 INMUNIZACIONES <i>IN VIVO</i>  | 49 |
| 5-4 DOSAJE DE ANTICUERPOS  | 50 |
| 6- DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO     | 51 |
| 7- ESTUDIO DE LAS SEÑALES INTRACELULARES TEMPRANAS                           | 51 |
| 7-1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE $Ca^{2+}$ INTRACELULAR              | 51 |
| 7-2 PURIFICACIÓN DE PKC  | 51 |
| 7-3 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE PKC   | 52 |
| 7-4 CUANTIFICACIÓN PROTÉICA  | 52 |
| 7-5 IMMUNOBLOT DE PKC  | 53 |
| 7-6 ACTIVIDAD de NF- $\kappa$ B  | 53 |
| 7-6-a OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES                                   | 53 |
| 7-6-b ENSAYOS DE WESTERN BLOT  | 54 |
| 7-6-c ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)                             | 54 |
| 7-7 ENSAYO DE AMP CÍCLICO (cAMP)   | 55 |
| 8- ENSAYO DE UNIÓN DE FITC-CON A   | 55 |
| 9-REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR CORTICOIDES Y CATECOLAMINAS          | 55 |
| 9-1 DETERMINACIÓN DE CATECOLAMINAS   | 55 |
| 9-2 DETERMINACIÓN DE AMINAS  | 56 |
| 9-3 DETERMINACIÓN DE CORTICOSTERONA  | 56 |
| 9-4 ACCIÓN DE CORTICOIDES Y CATECOLAMINAS SOBRE LA REACTIVIDAD INMUNOLÓGICA  | 56 |
| 10- CAMBIOS EN EL BALANCE TH1/TH2.   | 56 |
| 11- ACCIÓN DE LAS INTERLEUQUINAS SOBRE EL COMPORTAMIENTO                     | 57 |
| 12- ANÁLISIS ESTADÍSTICO   | 57 |
| <b><u>RESULTADOS</u></b>   |    |
| 1-VALIDACIÓN DEL MODELO DE ESTRÉS CRÓNICO MODERADO.                          | 59 |
| 1-1 ANHEDONIA Y PÉRDIDA DE PESO  | 59 |
| 1-2 REVERSIÓN CON ANTIDEPRESIVOS   | 61 |
| 2- OTROS PARÁMETROS CONDUCTUALES ALTERADOS POR SOMETIMIENTO A ESTRÉS CRÓNICO | 62 |
| 2-1 ACTIVIDAD EXPLORATORIA EN UN AMBIENTE NOVEDOSO                           | 62 |
| 2-3 TEST DE EVITACIÓN INHIBITORIA  | 64 |
| 3-ANÁLISIS DE CAMBIOS ESTRUCTURALES Y MONOAMINAS IMPLICADAS EN DEPRESIÓN     | 65 |
| 3-1 CAMBIOS EN EL HIPOCAMPO  | 65 |
| 3-2 NIVELES DE CATECOLAMINAS Y SEROTONINA EN HIPOCAMPO                       | 67 |

|   |     |
|---|-----|
| 4- ANÁLISIS <i>IN VITRO</i> DE LA RESPUESTA INMUNE.   | 68  |
| 4-1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE MITÓGENOS   | 68  |
| 4-2 RELACION TEMPORAL ENTRE LA EXPOSICIÓN A CMS Y LA APARICION DE<br>ALTERACIONES EN LA RESPUESTA PROLIFERATIVA | 70  |
| 5- ANÁLISIS <i>IN VIVO</i> DE LA RESPUESTA INMUNE   | 71  |
| 5-1 ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA POR CMS  | 71  |
| 6- DISTRIBUCIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS   | 73  |
| 7-SEÑALES INTRACELULARES  | 74  |
| 7-1 SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN LINFOCITOS T   | 74  |
| 7-1-a DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE $Ca^{2+}$   | 74  |
| 7-1-b ACTIVACIÓN DE PKC TRAS LA ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS T CON CON A   | 76  |
| 7-1-c EXPRESIÓN DE PKC EN LT  | 77  |
| 7-1-d ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE LA VIA NF- $\kappa$ B  | 78  |
| 7-1-e CONCENTRACIÓN DE cAMP   | 79  |
| 7-1-f DISTRIBUCIÓN DE SUBPOBLACIONES EN LA FRACCIÓN ENRIQUECIDA DE CÉLULAS T                                    | 80  |
| 7-1-g INDUCCIÓN DE LA PROLIFERACIÓN POR TRATAMIENTO CON PMA Y IONÓFORO DE $Ca^{2+}$                             | 81  |
| 7-1-h ANÁLISIS DEL NÚMERO DE SITIOS DE UNIÓN A CON A  | 82  |
| 7-2 SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN LINFOCITOS B   | 83  |
| 7-2-a ACTIVIDAD DE PKC EN LB  | 83  |
| 7-2-b ALTERACIÓN DE LA VÍA NF- $\kappa$ B EN LB POR EXPOSICIÓN A ESTRÉS CRÓNICO                                 | 85  |
| 7-2-c CONCENTRACIÓN DE cAMP EN LB   | 86  |
| 8- INFLUENCIA DE CORTICOSTERONA Y CATECOLAMINAS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE                                       | 87  |
| 8-1 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA Y CATECOLAMINAS  | 87  |
| 8-2 EFECTO DE LAS HORMONAS DEL ESTRÉS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE   | 89  |
| 9- CAMBIOS EN EL BALANCE TH1/TH2  | 91  |
| 9-1 DETERMINACIÓN DE INTERLEUQUINAS   | 91  |
| 9-2 ACCIÓN DE LA INTERLEUQUINA-6 SOBRE EL COMPORTAMIENTO  | 93  |
| 9-2-a ANHEDONIA   | 93  |
| 9-2-b ACTIVIDAD EXPLORATORIA EN UN AMBIENTE NOVEDOSO  | 94  |
| 9-2-c CAMBIOS ESTRUCTURALES EN HIPOCAMPO  | 95  |
| <u>DISCUSIÓN</u>  | 97  |
| <u>CONCLUSIONES</u>   | 114 |
| <u>REFERENCIAS</u>  | 116 |

# INTRODUCCIÓN

---

Numerosas evidencias demuestran que el Sistema Neuroendocrino (SNE) modula la función inmunológica y, a su vez, mediadores solubles del Sistema Inmune (SI) son capaces de influenciar la función neuroendocrina. Asimismo, se ha demostrado que variables psicológicas pueden condicionar esta interrelación.

En estudios con humanos el principal foco de atención ha sido establecer si existe una asociación entre las características psicológicas (rasgos o estados) y la inmunidad, qué circuitos de conexión - biológicos y conductuales - pueden explicar dicha relación y a través de qué vías las alteraciones inmunológicas pueden ser inducidas psicológicamente con la consecuente susceptibilidad a contraer enfermedades que afecten tanto el SI como el SNE.

Tanto el sistema nervioso como el inmunológico mantienen la integridad en un mundo demasiadas veces hostil. El sistema nervioso reconoce las amenazas procedentes del exterior y organiza acciones sobre blancos específicos del organismo. El SI tiene la función de reconocer sustancias extrañas eliminándolas del organismo. Tanto el sistema nervioso como el inmune mantienen una comunicación a larga distancia utilizando mensajeros químicos y preservan una memoria de acontecimientos del pasado.

En la última década el área de la psiconeuroinmunología se ha desarrollado como una significativa disciplina biomédica. Podemos hablar ahora del SI, el SNE y el sistema nervioso central (SNC) como parte de un sistema integrado de respuesta dado que comparten ligandos (hormonas y neurotransmisores) y receptores formando una compleja red de información bioquímica. Dependiendo del estado físico y psicológico del organismo, esta red puede funcionar como protectora o como un factor que interrumpe el estado de salud llevando a la aparición de enfermedades específicas o comportamientos anormales. Entre los factores que pueden alterar el equilibrio del organismo se encuentra el estrés, de fundamental trascendencia en los tiempos actuales, ya que ha dejado de ser un factor ocasional para convertirse en un malestar permanente.

A continuación se describirá brevemente el sistema inmune, su regulación e interrelación con el SNE y las consecuencias fisiopatológicas que surgen de la alteración del diálogo que mantienen permanentemente.

## 1- EL SISTEMA INMUNE

El Sistema Inmune (SI) consta de una serie de órganos, tejidos y células ampliamente distribuidos por todo el organismo. Los distintos órganos linfoides están interconectados por vasos sanguíneos y vasos linfáticos, de modo que se constituye un sistema unitario, entrelazado y bien comunicado. Estos vasos transportan células del sistema inmune, de las cuales el tipo central es el linfocito.

Funcionalmente, los órganos linfoides se clasifican en primarios y secundarios. Los primeros constituyen el sitio donde los linfocitos se diferencian a partir de las células primordiales linfoides, proliferan y maduran hasta convertirse en células funcionales. En los mamíferos, las células T maduran en el timo y las células B, en el hígado fetal y en la médula ósea. Los órganos linfoides secundarios incluyen el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a la mucosas, como las amígdalas y las placas de Peyer del intestino. El tejido secundario es el lugar donde el microorganismo o antígeno (Ag) es capturado, aportando el microambiente adecuado para que los linfocitos interactúen con él (Roitt, 2002).

### 1-1 LA RESPUESTA INMUNE. TIPOS Y CÉLULAS EFECTORAS.

La respuesta inmune es la respuesta realizada por el SI ante un agente no reconocido como propio y agrupa todos los eventos de acción frente a la misma. La respuesta inmune puede ser: **inespecífica** (innata) o **específica** (adquirida/adaptativa). La respuesta inmune inespecífica representa el primer sistema defensivo del organismo y no requiere sensibilización previa. Este tipo de respuesta es mediada por células con capacidad fagocítica y células asesinas naturales (NK). La respuesta específica se desarrolla sólo frente al agente que indujo su iniciación y en ella participan prioritariamente los linfocitos y los elementos solubles liberados por los mismos, anticuerpos (Ac) e interleuquinas (IL) (Roitt, 2002).

Durante las primeras horas de la agresión intervienen las barreras naturales de defensa y los primeros mecanismos innatos. A continuación (hasta el cuarto día) se produce la respuesta temprana inducida, que pertenece aún a la inmunidad innata, pero que sirve para mantener "a raya" la infección mientras se van activando los mecanismos específicos de la respuesta adaptativa. A partir de entonces entra en acción la inmunidad específica-adaptativa, dependiente de los linfocitos T (LT) y B (LB) específicos que previamente se han activado y proliferado clonalmente. Si el Ag entra por segunda vez la respuesta adaptativa tarda menos en montarse, debido a que este tipo de respuesta guarda memoria inmunológica específica (Roitt, 2002) (Figura 1).

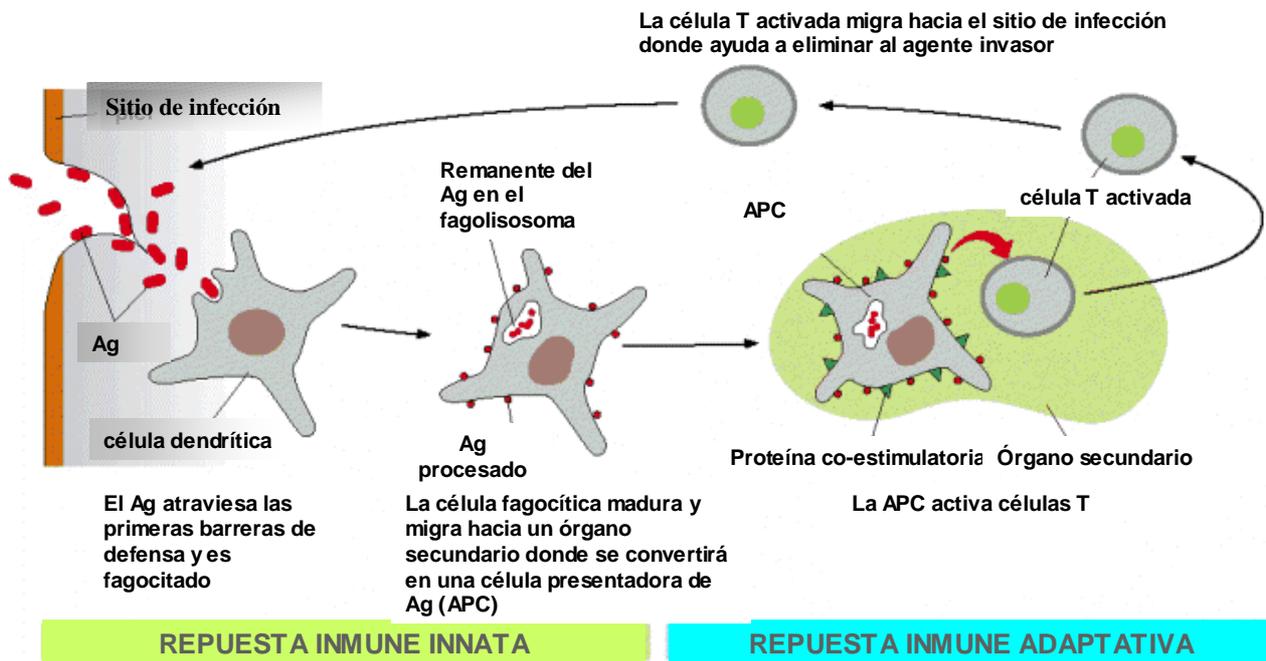


Figura 1. Respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa. Células fagocíticas del sistema inmune innato (macrófagos, células dendríticas) fagocitan al agente invasor (Ag) en el sitio de la infección. Esta célula madura y migra a través de vasos linfáticos al órgano secundario más cercano donde actúa como célula presentadora del Ag (APC). Los LT se activan y responden contra los Ag presentados en la superficie de las APC. Algunos LT activados migran al sitio de infección donde pueden ayudar a activar macrófagos o bien eliminar células infectadas (Alberts, 2002).

La respuesta inmune específica puede ser de dos tipos: **humoral y celular**. Aunque la separación de ambos tipos de respuesta es más bien didáctica que real, en general se considera que cuando el elemento efector final son los Ac formados por los linfocitos B se trata de una respuesta tipo humoral, mientras que cuando el efector final es el linfocito T se trata de una respuesta celular. Para que se inicie una u otra respuesta inmune se requiere el reconocimiento del antígeno a través de receptores específicos que se encuentran en la superficie de los linfocitos que llevan a la activación de los mismos. Los LB reconocen el antígeno mediante inmunoglobulinas (Ig) de membrana mientras que los LT lo reconocen mediante una estructura especializada denominada receptor de linfocitos T (TCR).

La respuesta inmune humoral es mediada por los linfocitos B que son las únicas células capaces de producir anticuerpos. Los LB responden a dos tipos distintos de Ag: los Ag timo-independientes (T-independientes), como las estructuras poliméricas presentes en la pared de las bacterias Gram-negativas (lipopolisacárido de membrana, LPS), que inducen una respuesta de Ac sin

necesidad de la colaboración de los LT y los Ag timo-dependientes (T-dependientes), como los glóbulos rojos de carnero (GRC) usados en forma experimental, que necesitan de las células T para producir una óptima producción de Ac (Roitt, 2002). La interacción de los Ag con sus receptores inicia la secuencia de activación de la célula B (estimula la proliferación y diferenciación), que finaliza en las células efectoras que secretan activamente Ac específicos contra el Ag que las activó (Figura 2A). Las Ig son de cinco clases o isotipos: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina D (IgD) e inmunoglobulina E (IgE) (Roitt, 2002).

Los receptores para los Ag T-dependientes en los LB son Ig de tipo IgD e IgM unidas a la membrana (BCR). El procesamiento y presentación de Ags T-dependientes a células T efectoras estimula la producción de citoquinas (CQs) (e.j., IL-4) y la expresión en superficie de CD40, que actúa sobre las células B para inducir la progresión y diferenciación del ciclo celular. Los Ag T-independientes se clasifican generalmente en dos tipos: los Ag TI-1 no estimulan las células B a través del BCR si no a través de receptores del tipo Toll (TLRs). Los Ags TI-2 tienen la habilidad de reaccionar de forma cruzada con BCR. Las respuestas a Ags TI, especialmente las TI-2, están generalmente aumentadas por la colaboración de LT. Un correlato *in vitro* de la respuesta T-independiente tipo 2 es la estimulación de células esplénicas de ratón con anti-CD40 más IL-4. El LPS, que a altas concentraciones estimula la activación policlonal de LB a través de TLR4 (Medzhitov, 2001), es utilizado como modelo de Ag T-independiente-1. Ambas condiciones gatillan fuertemente la proliferación y diferenciación de LB. La estimulación con un Ac anti-IgM estimula una respuesta TI-2 e induce una proliferación policlonal moderada de LB que es acompañada de una alta tasa de apoptosis (Anderson y col., 1996; Fruman y col., 1999).

Todas las células del sistema inmune tienen moléculas de superficie, algunas de las cuales son marcadoras de una dada población linfocitaria. En el caso de los linfocitos T, todos expresan el marcador CD3. Estos LT se subdividen en poblaciones funcionalmente distintas, siendo las células T colaboradoras (TH), positivas para el marcador de superficie CD4, y las células T citotóxicas (Tc), positivas para el marcador CD8.

La **respuesta inmune de tipo celular** cumple una importante función como mecanismo inmunológico de defensa, actuando principalmente frente a bacterias y virus, así como evitando la aparición y desarrollo de células tumorales. Tal como se ha dicho anteriormente, los linfocitos reconocen el Ag mediante el TCR. Los TH lo hacen sólo cuando el Ag es degradado y procesado en el interior de las células presentadoras de antígeno (APC) y sus determinantes antigénicos son

expuestos en la superficie de estas células en el contexto de una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II (Figura 2B).

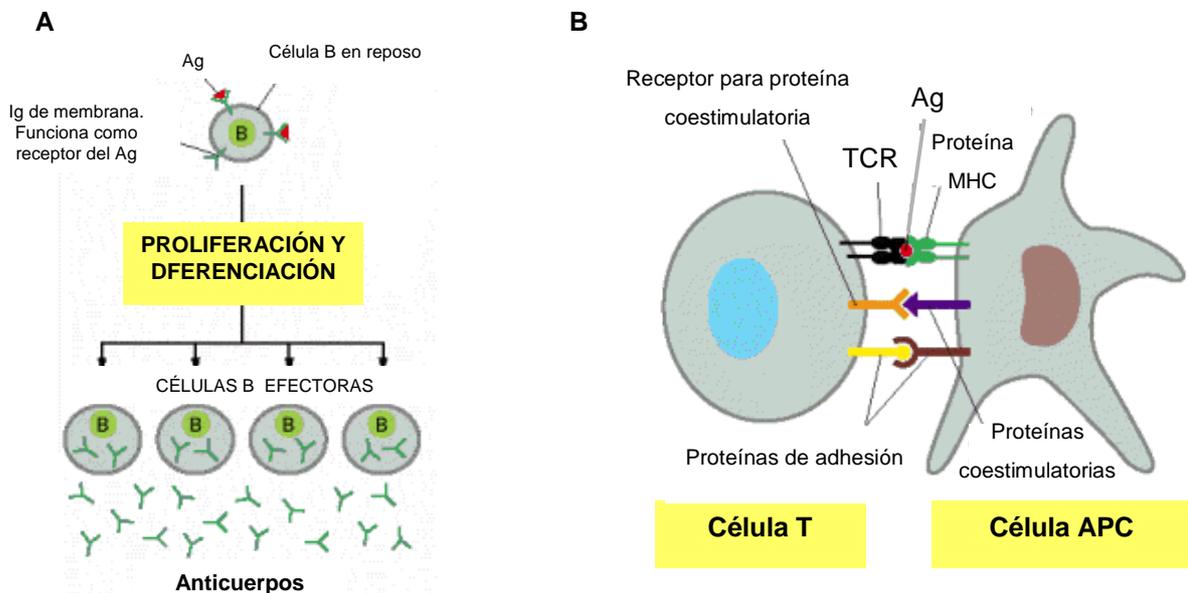


Figura 2. Activación de células B (A). Cuando las células B nativas o de memoria son activadas por el Ag, proliferan y se diferencian en células efectoras productoras de Ac. Activación de células T (B). Existen diferentes tipos de proteínas de superficie involucradas en la activación de LT quien reconoce al Ag mediante un receptor asociado a distintas moléculas co-estimuladoras (Alberts, 2002).

Las APC tienen como misión captar, procesar y presentar el Ag a los LT. El reconocimiento del Ag por las células T exige que previamente sea procesado proteolíticamente en el interior de las APC. Por otra parte, los linfocitos citotóxicos CD8<sup>+</sup> reconocen a los Ag que han sido procesados endógenamente en el citosol de la célula infectada y presentados en superficie por moléculas MHC de clase I.

Finalmente, debe distinguirse la respuesta inmune **primaria** de la **secundaria**. La respuesta inmune primaria se produce cuando el organismo se pone en contacto con un antígeno por primera vez. Es lenta, alcanza los niveles máximos de Ig tras un largo período de latencia (fase lag o de retardo) que es el tiempo requerido para la selección de un clon específico de células B y en la producción de células plasmáticas secretoras de Ac y de células B de memoria. Luego se produce un aumento exponencial (hasta alcanzar un pico máximo) seguido de una meseta y un posterior declive. En total la respuesta puede durar desde unos días a varias semanas, dependiendo de la persistencia del antígeno. Para Ags T-dependientes, se produce primero IgM, y luego IgG, siendo la contribución global de la IgM más importante en el primer contacto con el Ag

(Figura 3 A). Para este tipo de Ag, la respuesta secundaria posee diferencias importantes respecto a la respuesta primaria. Estas diferencias son cualitativas, se inicia más rápidamente (menor fase lag), alcanza más intensidad (100 a 1000 veces mayor), dura más tiempo y cuantitativas, se produce preferentemente IgG, aunque también IgA e IgE, en lugar de IgM (Figura 3 A).

Para Ags T-independientes, tanto en la respuesta primaria como en la secundaria, el Ac producido es de tipo IgM (Figura 3B).

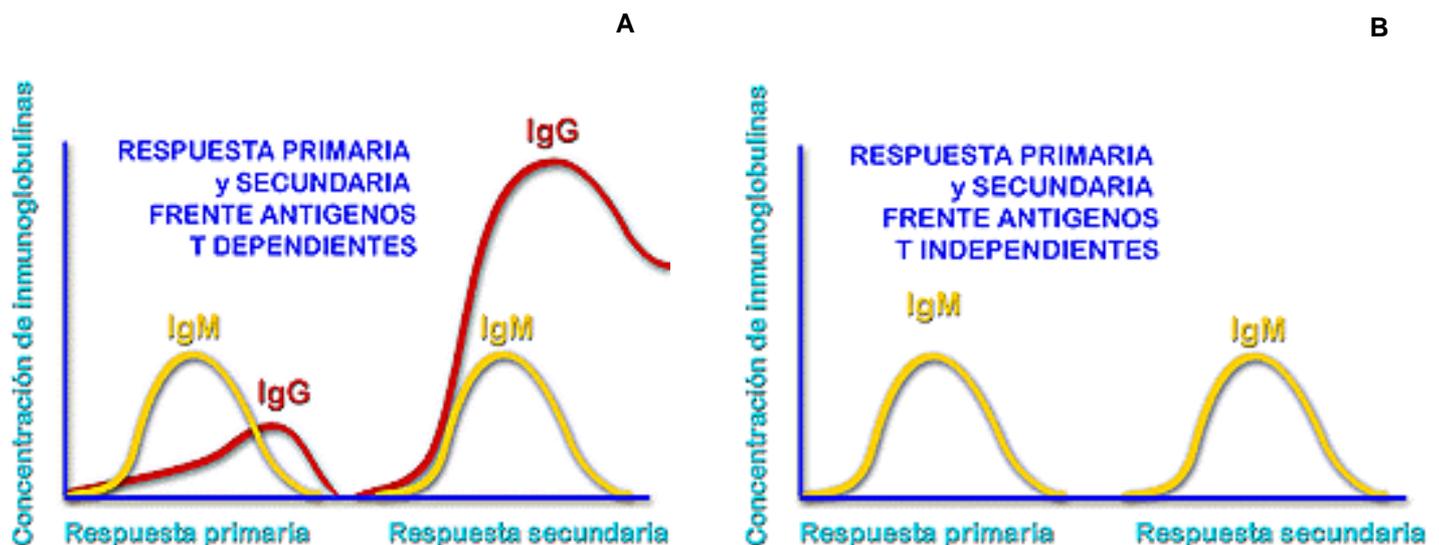
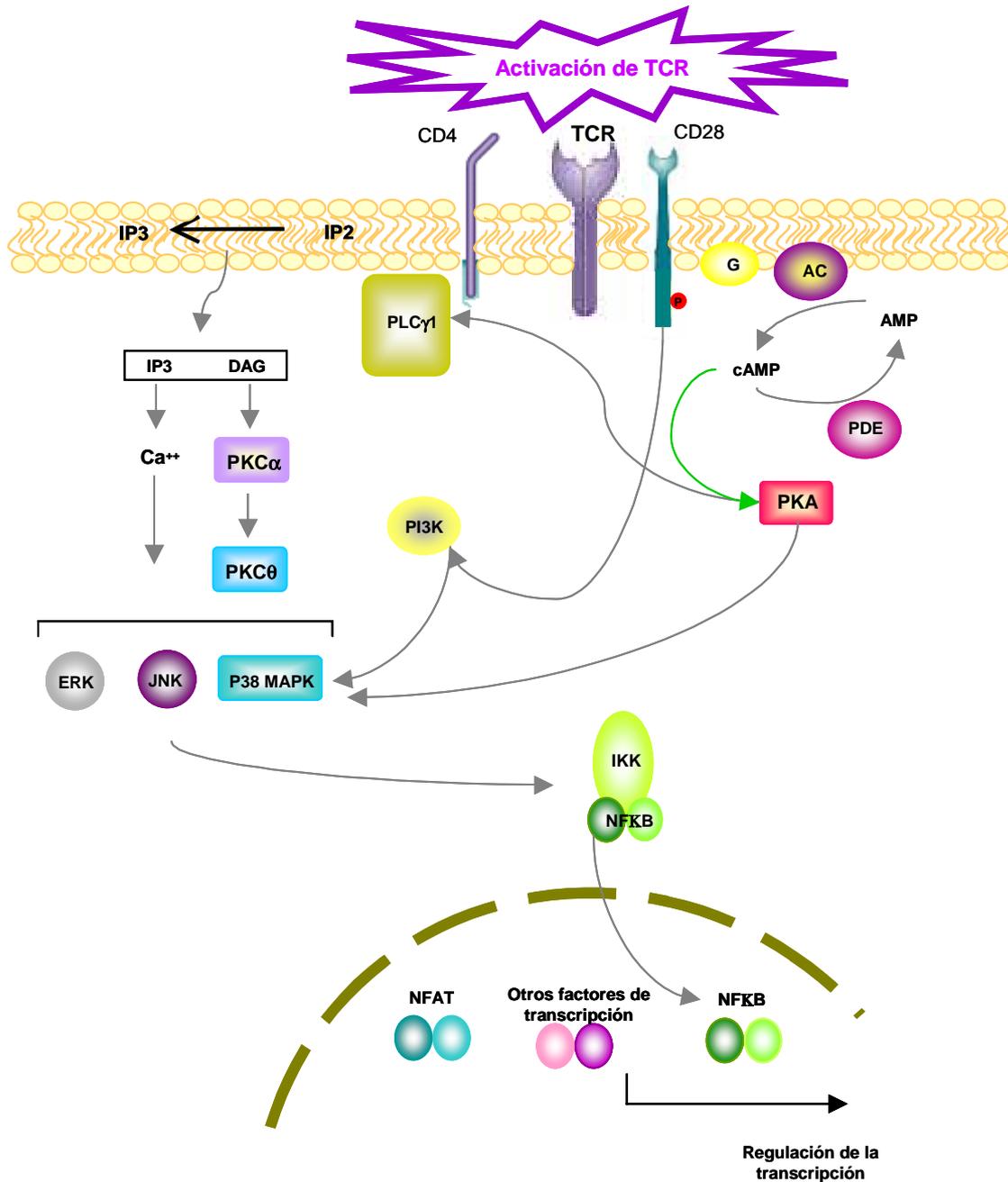


Figura 3: Respuesta primaria y secundaria. (A) La respuesta secundaria inducida por la re-exposición a un Ag T-dependiente es mayor y más rápida que la primaria y es específica indicando que el sistema inmune adaptativo ha recordado específicamente el encuentro anterior con el Ag que la indujo. (B) La respuesta a un Ag T-independiente es similar tanto frente a la primera exposición como la re-exposición al mismo Ag.

## 1-2 SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN LT Y LB

La activación del LT ya sea por presentación antigénica o por mitógenos específicos desencadena una compleja serie de eventos intracelulares que lleva a la activación, proliferación y diferenciación celular (Gelfand y col., 1987; Szamel y col., 1998). La vía de transducción de la señal se inicia por la interacción del TCR que provoca la activación obligatoria de las proteínas tirosinas quinasas (PTKs) que activan la fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) lo que conduce a la generación de inositol-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) en la membrana plasmática (Berridge, 1993) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>). IP<sub>3</sub> da lugar a la liberación de calcio (Ca<sup>2+</sup>) de los depósitos intracelulares lo que produce un aumento transitorio de su concentración citosólica. Estos segundos mensajeros activan la proteína quinasa C (PKC) (Szamel y col., 1998). Hasta la fecha se han descrito 11 isoenzimas de la PKC y se han clasificado en tres subfamilias, basadas en la estructura de su dominio y la habilidad de responder a Ca<sup>2+</sup> y DAG (Newton y col., 1998).

Estudios recientes demostraron que la isoforma  $\theta$  de la PKC (PKC  $\theta$ ), una isoforma "novel" expresada selectivamente en LT y en músculo esquelético (Baier y col., 1993), juega un papel crítico en la activación de LT. Tras la estimulación de LT, PKC  $\theta$  transloca al centro de la sinapsis inmunológica donde co-localiza con el TCR y este evento es esencial para la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y la proteína activadora 1 (AP-1) (Altman y col., 2000) que son requeridos para la proliferación celular y la producción de CQs. Recientemente se ha demostrado que PKC  $\alpha$  actúa río arriba de PKC  $\theta$  para activar la quinasa del inhibidor de NF- $\kappa$ B (IKKB) y NF- $\kappa$ B en linfocitos T (Trushin y col., 2003). La estructura de NF- $\kappa$ B está compuesta por un heterodímero formado por las subunidades p65 (RelA) y p50 o p52 (Sen y col., 1995). Este heterodímero está anclado a un grupo de proteínas inhibidoras (I $\kappa$ B) cuya función es retener a NF- $\kappa$ B en el citosol impidiendo su translocación al núcleo. Luego de la activación de ciertas vías de señalización se produce la hiperfosforilación sitio-específica de I $\kappa$ B lo que lo hace susceptible a ser ubiquitinizado y subsecuentemente degradado por la vía del proteasoma (Woronicz y col., 1997). Esto libera a NF- $\kappa$ B, permitiendo su translocación hacia el núcleo donde activa distintos genes blanco. Es importante señalar que la activación de TCR también involucra la participación de otras quinasas como las activadas por mitógenos (MAPKs), la quinasa extracelular regulada por señal (ERK), la quinasa NH<sub>2</sub>-terminal c-JUN (JNK) y p38 MAPK, y otros factores de transcripción como el factor nuclear de células T activadas (NFAT) (Graves y col., 1995). Por otro lado, la vía inhibitoria AMP cíclico/proteína quinasa A (cAMP/PKA) es la señal temprana mejor caracterizada implicada en la red de activación/inhibición de procesos que siguen la activación linfocitaria (Skalhegg y col., 1998; Aandahl y col., 2002) (Figura 4).

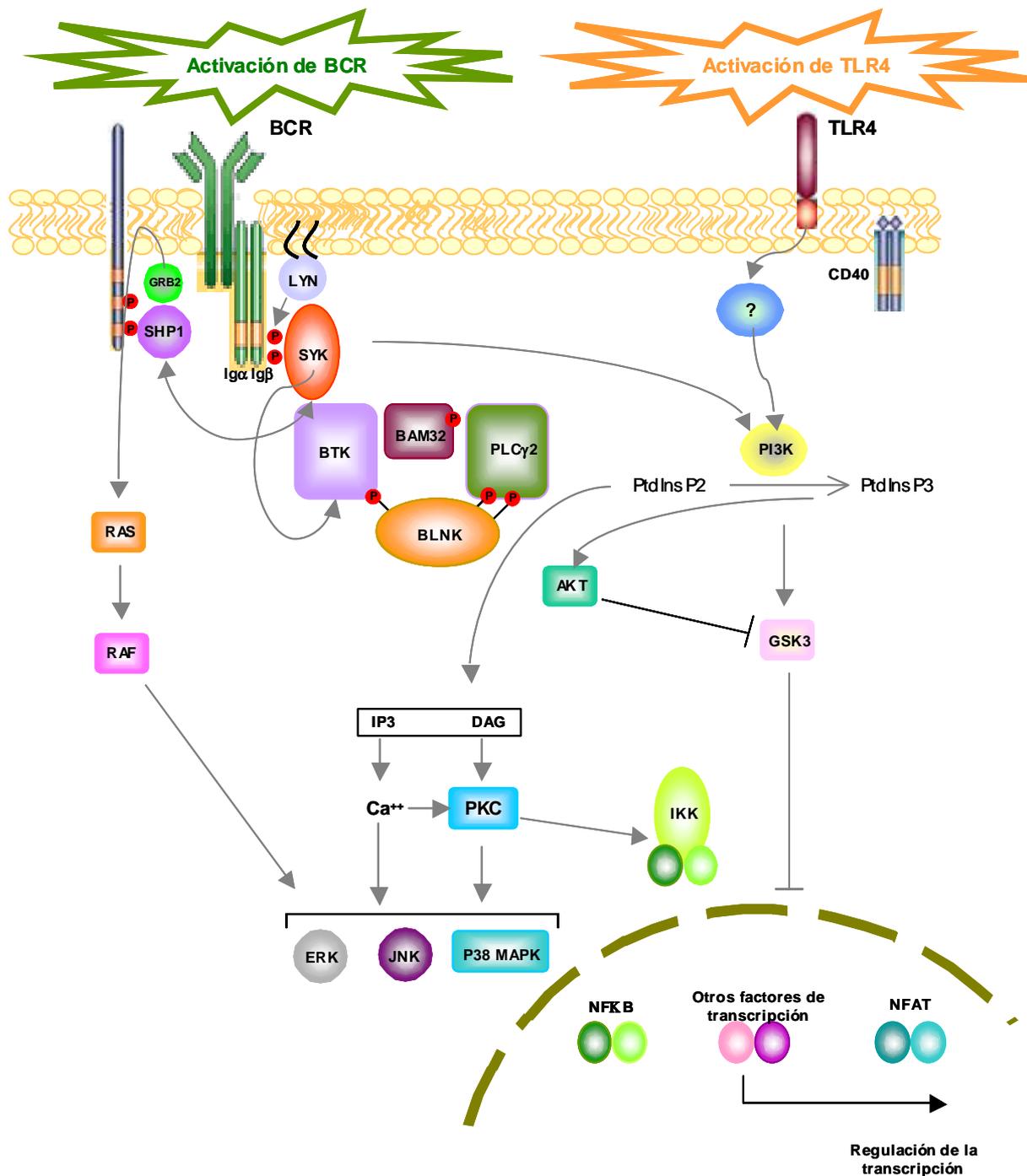


**FIGURA 4: ESQUEMA SIMPLIFICADO DE SEÑALIZACIÓN VÍA TCR**

La activación de LT requiere la estimulación del receptor T (TCR) y de señales co-estimulatorias. Las diferentes cascadas de señales inducen el aumento de Ca<sup>2+</sup> que permite la activación de distintos factores de transcripción involucrados en varias funciones celulares.

En LB, tras la unión del Ag al receptor B (BCR) se activan tres proteínas tirosina quinasas principales (PTKs): la quinasa de la familia SRC LYN, SYK y la quinasa de la familia TEC Btk. La fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la fosfolipasa C2 (PLC2) son importantes efectores de la señalización río abajo del BCR. Existen proteínas adaptadoras en LB, B-cell linker (BLNK) y BAM32 (B-lymphocyte adaptor molecule) que regulan finamente las señales conectando eficientemente las proteínas quinasas con las efectoras. Un producto de PI3K, el IP3, recluta algunos componentes de la señalización y activa además quinasas río abajo como la AKT. La activación de PLC2 induce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la activación de la proteína quinasa C (PKC)  $\beta$  siendo ambas cruciales para activación de MAPKs, ERKs, JNK, p38 y factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y NFATs. Los perfiles de estos caminos intracelulares determinan el destino (proliferación, diferenciación, sobrevida, muerte) de la célula B (Niuro y Clark, 2002) (Figura 5).

Para el caso de Ag T-independientes, tanto anti-IgM como LPS han demostrado inducir la activación de PI3K minutos después de la estimulación de LB (Gold y Aebersold, 1994; Bone y Williams, 2001). En el caso de la señalización vía BCR, la PI3K juega un rol crítico en la generación de un flujo sostenido de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, la señalización vía PI3K induce la activación de varias serin/treonin quinasas, incluyendo la quinasa AKT y la S6 (Fruman y Cantley, 2002). El LPS no induce el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bijsterbosch y col., 1985) pero sí gatilla la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de PI3K (Bone y Williams, 2001) a través de la activación de PKC (Procyk y col., 2000; Hara y col., 2003 )



**FIGURA 5: ESQUEMA DE SEÑALIZACIÓN VÍA BCR Y TLR4**

Dos proteínas efectoras, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y fosfolipasa C2 (PLC<sub>2</sub>), tienen papeles clave en la muerte, sobrevivencia y proliferación inducida por BCR y TLR4. Distintas vías que involucran diferentes proteínas están involucradas en estos procesos.

## 1-3 FACTORES SOLUBLES. RESPUESTAS TIPO TH1 Y TH2.

### 1-3-a CITOQUINAS

Dentro de los factores solubles que participan en la respuesta inmune ocupan un lugar destacado las citoquinas (CQs). Las CQs son un grupo de proteínas de bajo peso molecular que actúan mediando interacciones complejas entre células linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas.

Las CQs son producidas por células en respuesta a una gran variedad de estímulos y son capaces de regular el funcionamiento de otras células. La naturaleza de las células sobre las que ejercen su efecto está determinado por la presencia de receptores específicos. Estas proteínas pueden ser de diversos tipos entre los que se encuentran los denominados factores de crecimiento, polipéptidos que estimulan la proliferación de diferentes tipos celulares; los Interferones (IFN), que cumplen un papel muy importante en limitar la diseminación de ciertas infecciones virales y las interleuquinas (ILs), producidas principalmente por los linfocitos y de gran importancia en la regulación del SI (Roitt, 2002).

Aunque existen muchos tipos de células productoras de CQs, los más importantes son los linfocitos TH y los macrófagos, ya que sus CQs son esenciales para que se produzca la respuesta inmune una vez que se activan las células T y B por el contacto con las correspondientes APC.

La producción de las CQs suele ser breve (transitoria) y limitada al lapso de tiempo que dura el estímulo. En muchos casos ello se debe a que los correspondientes ARNm tienen una vida media corta. Considerando las diversas CQs, éstas pueden exhibir una o varias de las siguientes cualidades:

- pleiotropía (múltiples efectos al actuar sobre diferentes células).
- redundancia (varias CQs pueden ejercer el mismo efecto).
- sinergismo (dos o más CQs producen un efecto que se potencia mutuamente). Por ejemplo, en células B la acción conjunta de IL-4 e IL-5 induce el cambio de clase para que produzcan IgE.
- antagonismo (inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos). Por ejemplo, el IFN- $\gamma$  bloquea el cambio de clase promovido por IL-4.

Utilizando la analogía de lo que ocurre con las hormonas del sistema endocrino, la acción de las CQs puede ser de tipo autocrino, paracrino y, en pocas ocasiones, de tipo endocrino (Abbas, 1995).

### 1-3-b RESPUESTAS TIPO TH1 Y TH2

Los linfocitos TH se dividen en dos subpoblaciones, denominadas TH1 y TH2 de acuerdo al patrón de citoquinas que secretan.

Los TH1 suelen denominarse linfocitos T "inflamatorios" y los TH2 "coadyuvantes".

La diferenciación de células T tanto en células efectoras TH1 como TH2 determina la naturaleza de la respuesta inmune adaptativa que se activa subsecuentemente. Si una célula TH nativa se convierte en TH1 o TH2 depende principalmente de las CQs presentes cuando la célula TH es activada por una célula dendrítica madura en un órgano linfoide periférico (Figura 6).

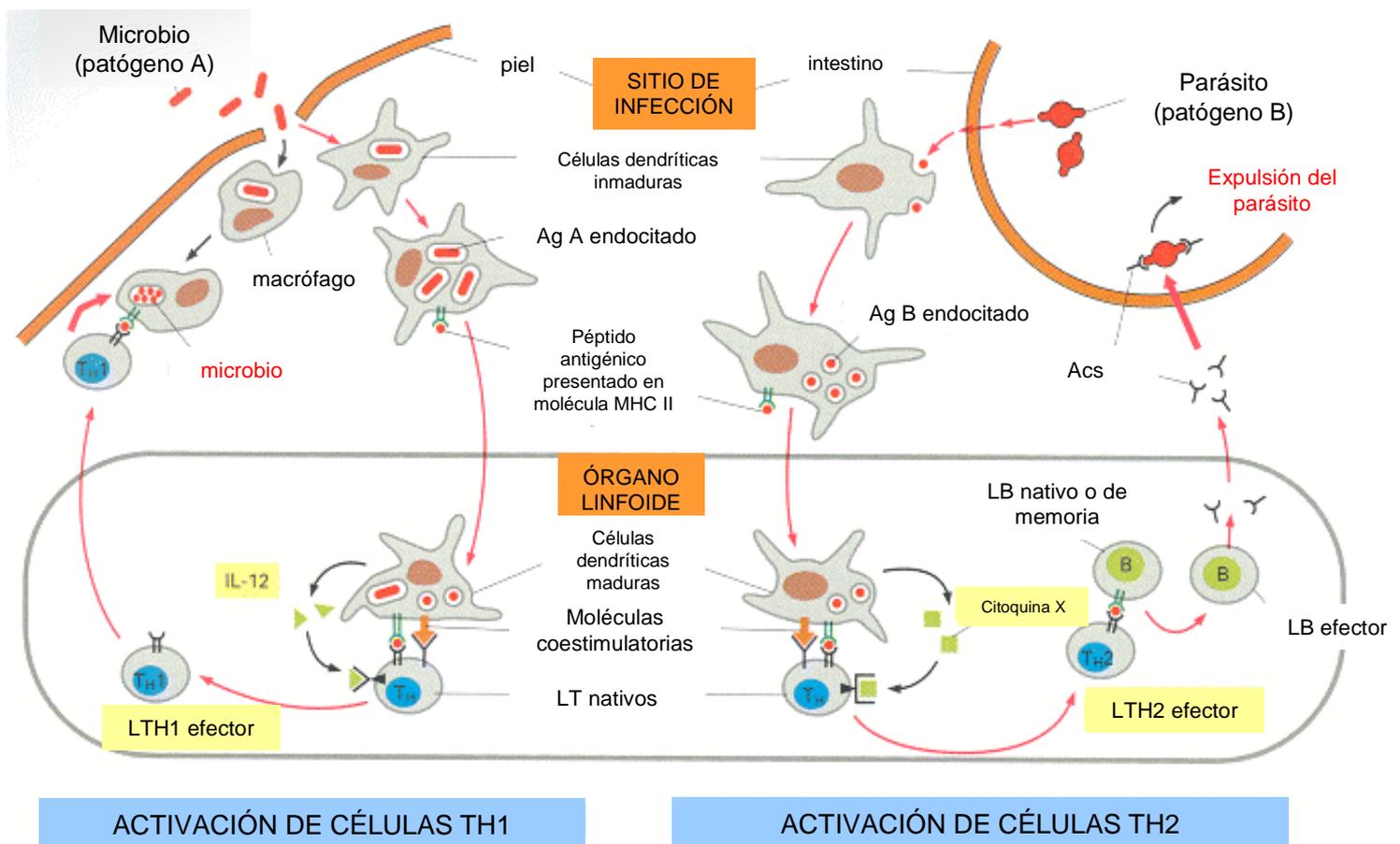


Figura 6: Activación de células TH1 y TH2. La diferenciación de células T en TH1 o TH2 depende principalmente de las CQs presentes cuando el Ag es presentado a la célula TH. La IL-12 producida por células dendríticas maduras promueve el desarrollo de células TH1. Si bien la CQ (X) producida por células dendríticas que promueve el desarrollo hacia TH2 no es conocida, la IL-4 producida por células T puede cumplir esta función. En la figura, la célula efectora TH1 producida en el órgano linfoide periférico migra al sitio de infección y ayuda a los macrófagos a deshacerse del microbio que ha fagocitado. La célula efectora TH2 permanece en el órgano linfoide y ayuda a activar a células B para que produzcan Acs contra el agente agresor.

Las células TH1 producen principalmente IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$ . Son responsables de funciones de inmunidad celular (activación de linfocitos Tc e hipersensibilidad de tipo retardado) destinadas a responder a parásitos intracelulares (virus, protozoos, algunas bacterias).

Las células TH2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, entre otras. Actúan como colaboradoras en la activación de las células B, y son más apropiadas para responder a bacterias extracelulares y a helmintos. También están implicadas en reacciones alérgicas: la IL-4 activa la producción de IgE y la IL-5 activa a los eosinófilos (Elenkov, 2004).

Las consecuencias de la respuesta inmune depende en buena medida de los niveles relativos de células TH1 y TH2: en una respuesta a patógenos intracelulares existe un aumento de CQs del tipo TH1, mientras que en respuestas alérgicas y ante helmintos es superior el nivel de las de TH2 (Roitt, 2002).

Un punto importante es la existencia de una regulación cruzada entre TH1 y TH2. El IFN- $\gamma$  secretado por las TH1 inhibe la proliferación de las TH2. Por su lado, la IL-10 secretada por las TH2 inhibe la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$  por parte de las TH1. Esta inhibición en realidad no es directa: la IL-10 produce un descenso marcado de la cantidad de MHC-II de las APC que, por lo tanto, ya no pueden ejercer bien su papel de activar a las TH1. Además, las CQs del tipo TH2 inhiben la producción del óxido nítrico (NO) y otros bactericidas en macrófagos, así como la secreción por estos macrófagos de IL-1, IL-6, IL-8 y otras CQs (Elenkov, 2004).

Este fenómeno de regulación negativa cruzada explica las ya antiguas observaciones de la existencia de una relación inversa entre la producción de anticuerpos (inmunidad humoral) y la hipersensibilidad de tipo retardado (respuesta típica de la inmunidad celular).

Es importante observar que los macrófagos y otras APC también producen CQs que regulan a su vez funciones inmunes efectoras. La IL-12 se produce en macrófagos activados en respuesta a infecciones bacterianas o de protozoos. Esta citoquina provoca la proliferación de células NK y TH1 que aumentan la producción de IFN- $\gamma$  induciendo la mayor activación de macrófagos. De esta forma se cierra este circuito de retroregulación positiva entre macrófagos y células TH1, destinado a potenciar funciones efectoras de la rama celular de la inmunidad (Trinchieri, 2003).

Por otro lado, los macrófagos se ven inhibidos por IL-4 e IL-10 secretadas por las TH2, representando otro ejemplo de la inhibición cruzada entre la rama especializada en la respuesta humoral y la centrada en la respuesta celular ante parásitos intracelulares.

El predominio de una u otra de las dos subpoblaciones de linfocitos TH depende a su vez del microambiente de CQs en que ocurre la activación y maduración inicial a partir de linfocitos en reposo: por ejemplo, *in vitro* se ha visto que si un TH se activa por antígeno en presencia de IL-4,

se desarrolla hasta TH2, mientras que si el entorno de activación es rico en IFN- $\gamma$ , se desarrolla hasta TH1.

## 2- REGULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

La respuesta inmune, al igual que todos los sistemas biológicos, está sujeta a mecanismos de control. Estos mecanismos de control aseguran que la respuesta inmune sea eficiente, para eliminar al agente invasor y también limitada, resituando al sistema inmune en un estado de reposo, cuando la respuesta a un determinado Ag ha dejado de ser necesaria (Sadek y Nemeroff, 2000).

Los mecanismos de regulación de la respuesta inmune pueden ser **autólogos**, ejercidos por el propio SI (Roitt, 2002) y entre los más importantes pueden mencionarse:

- Regulación por el Ag. La respuesta inmune efectiva elimina el Ag del sistema y, dado que es necesaria la exposición repetida al Ag para que los LT y los LB se mantengan en fase de expansión activa, dichas células vuelven a su estado de reposo. Es posible que algunos Ags no sean eliminados tan eficazmente lo que origina una respuesta inmune mantenida que a veces da lugar a consecuencias patológicas.
- Regulación por el Ac. El Ac es capaz por sí mismo de ejercer un tipo de control retroalimentado. La administración pasiva del Ac IgM junto con un Ag refuerza la respuesta inmune frente a este último, mientras que el Ac IgG suprime la respuesta. Los mecanismos por los cuales el Ac modula la respuesta inmune no están completamente definidos.
- Regulación por linfocitos. Como fuera mencionado, los LT a través de la secreción de CQs regulan la respuesta inmune.

Por otra parte, estudios recientes han mostrado que la regulación fisiológica del SI comprende una extensa red que involucra al Sistema Nervioso Central (SNC) y al sistema neuroendocrino a la que se denomina regulación **heteróloga** de la respuesta inmune. Esta red de conexiones a través de vías nerviosas, cascadas hormonales e interacciones celulares permite al SNC regular al SI localmente en los sitios de inflamación, regionalmente en los órganos inmunes y sistémicamente mediante rutas hormonales (Webster y col., 2002).

Dos componentes del SNE claramente involucrados en mantener la homeostasis son: el Sistema Nervioso Autónomo (SNA) y el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). Algunas de las evidencias que avalan esta regulación son:

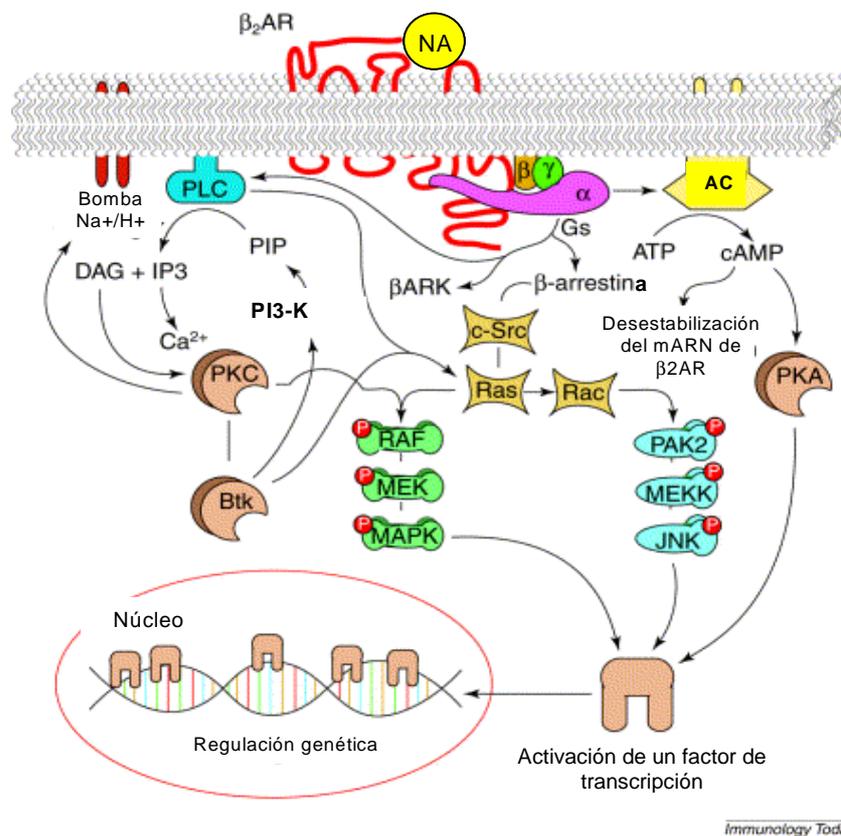
- La estimulación eléctrica de localizaciones específicas del cerebro puede alterar la función del sistema inmunológico. (Wrona y Trojnar, 2005; Wrona y col., 2004; Villasenor-García y col., 2001, Madden y col. 2001)

- La lesión cerebral altera el número de esplenocitos y timocitos, reduce la respuesta proliferativa a mitógenos de las células T, y reduce la actividad de las células NK. (Huang y col., 2003 ; Zhao y col., 2002 )
- En ratones simpatectomizados se reduce la producción de anticuerpos ante la inmunización, se suprime la respuesta citotóxica de las células T, disminuye la reacción de hipersensibilidad retardada, aumenta la actividad de las células NK. (Li y col. 2004; Vega y col. 2003; Callahan y Moynihan, 2002)
- La activación del SI se correlaciona con alteración de la actividad neurofisiológica, neuroquímica y neuroendocrina de las células cerebrales. (Saphier, 1989; Saphier y col., 1988; Stenzel-Poore y col.,1993; Pauli y col., 1998)
- Los órganos linfoides se encuentran inervados por fibras del sistema nervioso autónomo. (Felten y col., 1987; Felten y col., 1998)
- Los linfocitos tienen receptores para varias hormonas y neuropéptidos: CRF, ACTH, opiodes endógenos (endorfinas) (Benou y col., 2005; Cupic y col., 2005; Henning y col., 2005; Wermerskirchen y col., 2000)

## **2-1 REGULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE POR EL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO.**

El SNA regula las actividades de las estructuras que no se encuentran bajo control voluntario y que funcionan por debajo del nivel del conocimiento. Este sistema presenta tres subdivisiones principales: el sistema nervioso simpático (SNS), el sistema nervioso parasimpático (SNP) y el sistema entérico. Las fibras nerviosas autonómicas secretan acetilcolina (Ach, fibras colinérgicas) o noradrenalina (NA, fibras noradrenérgicas). Los axones del SNS se extienden a lo largo del organismo permitiendo la regulación de diversas funciones. La mayoría de sus fibras post-ganglionares liberan NA que cumple un rol de neurotransmisor/neuromodulador en los órganos linfoides (Straub y col., 1998). Existe una inervación simpática del timo y del bazo. Ramas axonales del Sistema Nervioso Autónomo terminan, a través de los órganos linfoides, en la superficie de los linfocitos. Existen terminales del SNS en el bazo, timo y médula ósea, que son localizaciones cruciales para la síntesis y almacenamiento de los linfocitos (Felten y col., 1987). La NA liberada por las terminales nerviosas ejerce su función a través de receptores adrenérgicos presentes tanto en LT como en LB. El principal subtipo de receptor adrenérgico descrito en los linfocitos es el  $\beta_2$  ( $\beta_2$ AR) (Bylund y col., 1994). Este receptor es un clásico receptor de siete dominios transmembrana que tras su estimulación induce la activación de una proteína G heterotrimérica. Históricamente, la capacidad de señalización del  $\beta_2$ AR ha sido atribuida a la asociación de la cola citoplasmática del receptor con proteínas G estimuladoras lo que resulta en la activación de la adenilato ciclasa (AC), el incremento intracelular de adenosin 3',5'- monofosfato

cíclico (cAMP), y un aumento de la actividad de la proteína quinasa A (PKA) (Kobilka, 1992; Meinkoth y col., 1993). Luego de la activación, la PKA regula la actividad de múltiples vías por fosforilación, incluyendo varios factores de transcripción como NF- $\kappa$  B. (Strosberg, 1998). Sin embargo, la estimulación de  $\beta_2$ AR en otros tipos celulares activa varios mediadores intracelulares adicionales (Figura 7) que también son utilizados por receptores relacionados con el SI como receptores de CQs, el receptor de células B (BCR) y CD40, y estos mediadores contribuirían con la influencia secundaria que tendría la NA sobre la función de células inmunes. Así, estos intermediarios de señalización compartidos representan un mecanismo por el cual la NA influenciaría la función linfocitaria (Kohm y Sanders, 2000). Finalmente, es importante notar que durante estados patológicos específicos, las células T y B in vivo expresarían otros subtipos de receptores adrenérgicos como el  $\alpha_2$ AR, que estimularían una variedad de eventos intracelulares opuestos y/o adicionales a los mencionados anteriormente.



*Immunology Today*

Figura 7: Señales intracelulares activadas tras estimulación de  $\beta_2$ AR.

La unión de NA al  $\beta_2$ AR clásicamente induce la acumulación de cAMP intracelular y la activación de PKA. Estudios realizados en células no inmunes han revelado que la estimulación  $\beta_2$ AR también activa otros mediadores intracelulares como PLC, PI 3-K, PKC, Btk y MAPK lo que resulta en la activación de numerosos factores de transcripción y en la regulación de diversos genes. Muchos de estos intermediarios de la señalización intracelular (PKC, PLC y PI 3-K) también participan en las cascadas de señalización activadas por varios receptores asociados a la función inmune como CD40 y BCR contribuyendo así a los efectos de NA sobre la función linfocitaria.

Abreviaturas:  $\beta$ ARK, quinasa asociada a  $\beta_2$ AR; Btk, tirosina quinasa de Bruton; Gs, proteína G; IP3, inositol (1, 4, 5)-trifosfato; JNK, quinasa c-Jun N-terminal; MEK, MAP quinasa quinasa; MEKK, MAP quinasa quinasa quinasa; P, fosfato; PI 3-K, fosfatidilinositol-3-quinasa; PIP2, (4,5)-bisfosfato; AC, adenilato ciclasa

Cabe destacar que los  $\beta_2$ AR están expresados en la superficie de células B en reposo y activadas, de células CD8+, de células T nativas CD4<sup>+</sup> y de células TH1, mientras que no están expresados en células TH2 (Kohm y Sanders, 1999; Sanders y col., 1997 ; Ramer-Quinn y col., 1997)

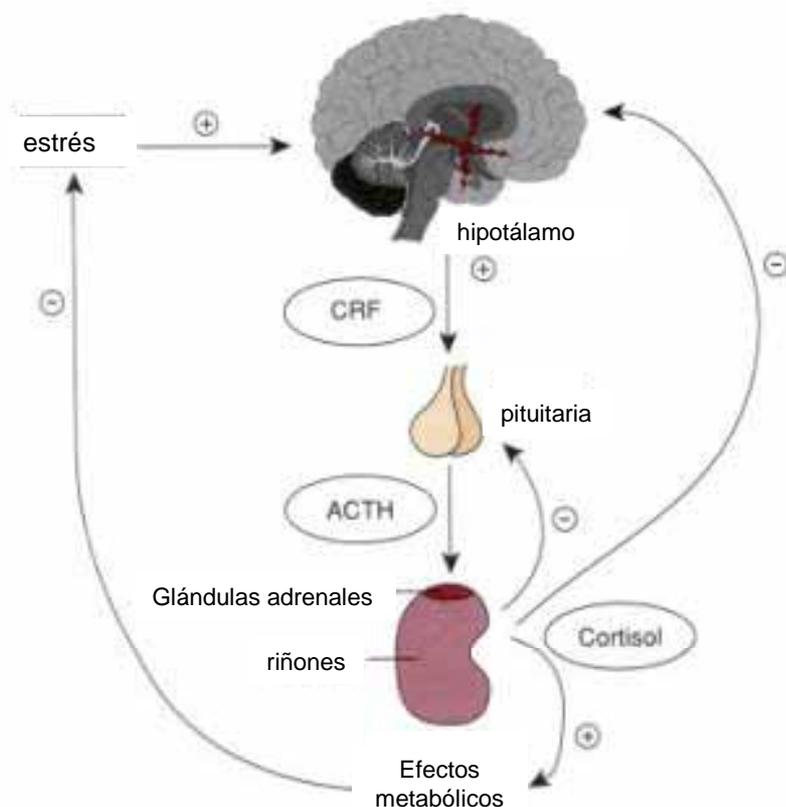
Clásicamente, se ha descrito que la estimulación de los  $\beta_2$ AR por agonistas selectivos como el isoproterenol conduce a una inhibición de la respuesta proliferativa de linfocitos T inducida por mitógenos o por Ac anti-CD3 (Carlson y col., 1989; Feldman y col., 1987, Bauman y col., 1994). Sin embargo, la caracterización posterior de subpoblaciones linfocitarias, así como la disponibilidad de técnicas más sensibles han permitido obtener datos que sugieren que la NA ejerce una variedad de efectos sobre la función de células T CD4<sup>+</sup>, dependiendo tanto del tiempo de activación celular como del subtipo específico de CD4<sup>+</sup> involucrado. Así, la exposición de células nativas CD4<sup>+</sup> a NA promovería la diferenciación mediada por IL-12 de estas células a células efectoras TH1, así como la producción de IFN- $\gamma$  por estas células (Swanson y col., 2001). Contrariamente, la NA parece no tener efecto en la diferenciación hacia TH2 mediada por IL-4. Sin embargo, si clones TH1 son expuestos a NA se produce menos IFN- $\gamma$  (Sanders y col., 1997). Así, estos y otros resultados desafían el dogma que establece que la NA y la subsecuente estimulación de los  $\beta_2$ AR sólo suprime la función T CD4+ y sugiere que el estado de activación de la célula T es crítico para definir el efecto de la NA sobre la función celular. Según estos hallazgos, existiría una potencial interacción entre los  $\beta_2$ AR y vías de señalización específicas de receptores inmunes como los de IL-12, IFN- $\gamma$  o TCR. Finalmente, la activación celular aumentaría el nivel de expresión de  $\beta_2$ AR en células TH1 CD4+ (Ramer-Quinn y col., 1997) y así influenciaría la respuesta de estas células a NA. La influencia de la NA sobre la función de células TH1 está relacionada con la habilidad de estas células de “ayudar” a las células B a producir Ac. El nivel de IFN- $\gamma$  producido por una célula TH1 modula el nivel de IgG2a producido por una célula B, ya que los LB producen niveles aumentados de IgG2a cuando son incubados con sobrenadantes de células TH1.

Además de la habilidad de la NA de influenciar la función de LB indirectamente vía alteraciones en la producción de CQs TH1, también lo hace directamente. Así, las células B producen niveles incrementados de IgG1 e IgE cuando son expuestas a NA tanto durante el procesamiento antigénico o dentro de las primeras doce horas de cultivo con células TH2. Interesantemente, las células B producen niveles aumentados de IgG2a sólo cuando son expuestas a NA 12 horas después del cultivo con células TH1. Además, la exposición de células plasmáticas secretoras de Ac a NA resulta en la disminución de los niveles de Ac producidos (Melmon y col., 1974). Así, al igual que en las células T CD4+ , el estado de activación de la célula B determina el efecto de la NA sobre la función celular. Finalmente, se ha descrito que la NA modularía la expresión de

moléculas co-estimuladoras de superficie asociadas al receptor para el Ag en LT y LB (Suarez y col., 1997; Kasproicz y col., 2000). Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para definir el mecanismo preciso por el que la NA modula el nivel de expresión de estas moléculas.

## 2-2 REGULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE POR EL EJE HIPOTALAMO-PITUITARIO-ADRENAL.

El eje HPA es una parte principal del sistema neuroendocrino, comprendiendo las interacciones del hipotálamo, la glándula pituitaria y las glándulas adrenales. Es considerado como una parte fundamental en las reacciones del cuerpo al estrés. En el hipotálamo, el factor liberador de corticotropina (CRF) es secretado por neuronas del núcleo paraventricular, y luego transportado vía circulación portal hipotálamo-pituitaria a la hipófisis anterior, donde estimula la secreción de hormona adrenocorticotrofina (ACTH). La ACTH entra a la circulación periférica y estimula la secreción de glucocorticoides (GCs) por la corteza adrenal (cortisol en los primates y corticosterona en la mayoría de los roedores) y catecolaminas por la médula adrenal. Los GCs generan una retroalimentación negativa sobre la hipófisis anterior y el hipotálamo, a través de receptores glucocorticoides (GCRs), lo cual normalmente mantiene los niveles de cortisol dentro del rango esperado (Webster y col., 2002). (Figura 8)



**FIGURA 8: ESQUEMA DEL EJE HPA**

Las células del hipotálamo producen CRF en respuesta a casi cualquier tipo de factor estresor ya sea físico o psicológico que se une a receptores en células de la glándula pituitaria que producen ACTH.

La ACTH es transportada hacia la glándula adrenal donde estimula la producción de hormonas adrenales.

La liberación de GCs inicia una serie de efectos metabólicos con el fin de aliviar los efectos del estrés y a su vez regula negativamente su propia secreción y la de ACTH actuando sobre el hipotálamo y la pituitaria.

El eje HPA está sujeto a ser regulado tanto por el SNC como por la periferia. Los mismos GCs regulan negativamente el eje a nivel hipotalámico y pituitario por un mecanismo de retroalimentación negativa. El eje HPA también puede ser regulado por otros factores como el sistema nervioso simpático, CQs y otros neuropéptidos como arginina vasopresina (AVP) (Scott y Dinan, 1998; Patel y col., 2004; Ma y Morilak, 2005; Lowry, 2002).

Las conexiones entre el sistema neuroendocrino y el SI suponen un sistema regulatorio finamente ajustado requerido para la salud. Cualquier disturbio a nivel del eje HPA o alguna acción de los GCs puede conducir al desbalance de este sistema y aumenta la susceptibilidad a contraer infecciones, desarrollar enfermedades autoinmnes o inflamatorias (Beishuizen y Thijs, 2003; Koller y col., 2004; Huitinga y col., 2004; Silverman y col., 2005; Bomholt y col., 2004; Cancedda y col., 2002; Kavelaars y col., 2000).

Los corticosteroides pueden deprimir el SI mediante varios mecanismos entre los que pueden mencionarse :

- Disminuir la acción de las CQs tanto inhibiendo su liberación como disminuyendo la sensibilidad de sus células diana. Por ejemplo, los corticosteroides reducen el número de receptores de IL-2 e inhiben la liberación de IL-1 (Kunicka y col., 1993; Chung y col., 2004; Belvisi, 2004; Elenkov, 2004).
- Bloquear la maduración linfocitaria. Se ha detectado una contracción del timo cuando el eje HPA está activado (Sacedon y col., 2000; Wisniewska y col., 2004; Berki y col., 2002).
- En algunas especies expulsan a los linfocitos de la circulación. (Milad y col., 1994) y en ocasiones destruyen linfocitos (Bishop y col., 2000).
- Se han detectado numerosos receptores de esteroides en los linfocitos, siendo una de las rutas por las que los corticoides ejercen su efecto inmunosupresor (Newton, 2000; Ashwell y col., 2000).
- Algunos autores sostienen que los ritmos circadianos del SI están en función del ritmo circadiano de los corticosteroides (Terao y col., 2002; Raida y col., 2002).

Sin embargo, la mayoría de estos hallazgos se han obtenido utilizando análogos sintéticos de los corticoides de mayor vida media como la dexametasona y en dosis farmacológicas. De allí que es importante conocer el rol endógeno de los GCs. Siendo moléculas lipofílicas, los GCs pueden traspasar la membrana plasmática de las células. Existen dos tipos de receptores de GCs, los receptores GCR y los receptores mineralocorticoides (MR). Como la corticosterona tiene mayor afinidad por estos últimos (Muller y col., 2002), a bajas concentraciones la hormona circulante se une preferentemente a MR. Sólo a altos niveles circulantes o altas concentraciones en el tejido (ej: durante un período de estrés) los GCR son ocupados (DeRijk y col., 2002). En células inmunes, como macrófagos y LT, el principal receptor para GCs es el GCR por lo que la influencia de estas

hormonas sobre la función inmune es mediada a través de este receptor (Marchetti y col., 2001). El receptor para glucocorticoides es un miembro de la superfamilia de los receptores esteroides. Cuando está desactivado, el GCR está en el citoplasma formando un complejo oligomérico con la proteína HSP90. La unión con el ligando hace que el receptor se disocie de este complejo y transloque al núcleo donde se une como un homodímero a elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) a través de una estructura espacial de dedos de zinc presentes en el dominio de unión al ADN (La Baer y Yamamoto, 1994). El complejo GCR–ligando puede influenciar la expresión genética modulando la transcripción a través de varios mecanismos. Como homodímeros, los receptores de GC reconocen un elemento de respuesta (Berg, 1989) pudiendo directamente aumentar o reprimir la transcripción de un gen. Es interesante notar que muchos genes de CQs que son regulados por GCs no poseen estos elementos de respuesta con lo que este modelo de transactivación no explicaría la regulación de la expresión genética de CQs por GCs (Padgett y Glaser, 2003)

Estudios realizados en los años 70's y 80's revelaron que los GCs inhiben la proliferación linfocitaria, su actividad citotóxica, y la secreción de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-2 e IFN- $\gamma$  (Beutler y col., 1986; Boumpas y col., 1993). Estas observaciones, en el contexto del amplio uso clínico de los GCs, inicialmente llevó a la conclusión de que funcionaban, en general, como inmunosupresores, y fueron usados como potentes agentes anti-inflamatorios. Sin embargo, evidencias recientes indican que a nivel sistémico los glucocorticoides causan una supresión selectiva de la inmunidad celular TH1 y un cambio hacia la inmunidad celular TH2, más que una inmunosupresión generalizada (Elenkov, 2004).

Por otra parte, la concepción de los GCs como inmunosupresores involucra la administración de altas dosis farmacológicas de moléculas sintéticas como la dexametasona. De hecho, niveles fisiológicos de GCs endógenos tienen un importante efecto estimulante sobre varios aspectos de la respuesta inmune. Por ejemplo, varios procesos relacionados a la función de células T son facilitados (Wilckens y De Rijk, 1997). En cuanto a la función de células B y la producción de Acs, el rol de los GCs endógenos no está del todo establecido. Aunque algunos estudios han encontrado una correlación positiva entre el incremento de GCs inducidos por estrés y un aumento en la producción de Acs (Moynihan y col., 1994), otros estudios demuestran lo contrario (Del Rey y col., 1984). Finalmente, la administración de GCs puede resultar tanto en un incremento (Tuchinda y col., 1972) como no tener efecto sobre el nivel de Acs en plasma (Fleshner y col., 1996).

### 3- EFECTOS DEL SISTEMA INMUNE SOBRE LA ACTIVIDAD NEUROENDOCRINA.

La activación del SI se ve acompañada de cambios en procesos hipotalámicos, autonómicos y endocrinos. Así por ejemplo la respuesta inmunológica a las infecciones se acompaña de incrementos dramáticos de ACTH y de corticoides.

Las CQs serían los mediadores del sistema inmune responsables de los cambios observados en el SNE. Asimismo se ha observado que las CQs pueden influir en la conducta: IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  y el factor de necrosis tumoral (TNF) influyen en la activación del eje HPA y son afectadas por la secreción de GCs.

El tratamiento con interferón en humanos ha evidenciado que produce efectos neurológicos y psiquiátricos. CQs administradas exógenamente inducen una gran cantidad de síntomas, conocidos en su conjunto como la conducta realcionada con la sensación de enfermedad ("sickness behaviour"), que incluyen malestar, debilidad, fatiga, falta de sueño y desinterés por actividades corrientes como la alimentación e interacciones sociales (Dantzer, 2001; Anisman y col., 2005; Dantzer, 2004). Los síntomas neurovegetativos son claramente prominentes en esta descripción. Tanto en humanos como en animales, la activación del SI está asociada con la reducción de la ingesta y patrones de sueño alterados (Plata-Salaman y col., 1998; Pollmacher y col., 2000). Adicionalmente, la fatiga es frecuente en pacientes que sufren algún tipo de enfermedad de base inmune, así como en pacientes tratados con CQs (Kurzrock, 2001; Malik y col., 2001).

Pacientes sometidos a terapias con IL-2 o IFN- $\gamma$  para tratamiento de cáncer desarrollaron no sólo tristeza y pérdida de interés sino que también presentaron disturbios cognitivos y síntomas neurovegetativos como pérdida de apetito, fatiga o alteraciones del sueño durante el curso de la terapia (Capuron, y col., 2000; Capuron y col., 2002b). La aparición de estos síntomas parece depender de la modalidad del tratamiento usada. Así, síntomas depresivos y alteraciones cognitivas del tipo fronto-subcortical se desarrollan tempranamente (primera semana de tratamiento) en pacientes que reciben IL-2. Contrariamente, síntomas depresivos se desarrollan recién después de varias semanas de tratamiento (4-8 semanas) en pacientes tratados con IFN- $\alpha$ . Es interesante notar que los síntomas neurovegetativos aparecen antes y más frecuentemente que las alteraciones de ánimo en ambos tipos de tratamiento. Esta distinción entre síntomas neurovegetativos y alteraciones de ánimo es apoyada por recientes hallazgos que muestran que el tratamiento profiláctico con el antidepresivo paroxetina bloquea el desarrollo de depresión mayor en pacientes sometidos a terapia con IFN- $\alpha$  mientras que tiene un efecto menor sobre los síntomas neurovegetativos, incluyendo fatiga (Musselman y col., 2001; Capuron y col., 2002a). En vista de estos datos parecería posible que las CQs ejercieran efectos diferenciales sobre el ánimo y las funciones neurovegetativas, probablemente a través de distintos mecanismos.

#### **4- INFLUENCIA DE LOS FACTORES PSICOLÓGICOS EN LA FUNCIONALIDAD DEL SISTEMA INMUNITARIO. EL ESTRÉS Y SUS CONSECUENCIAS.**

El SI actúa como defensa ante múltiples enfermedades. Los estudios previos muestran que existe una interrelación entre SNC y SI, pero no informan necesariamente si se producen cambios en la susceptibilidad a enfermar. Es preciso, por tanto, estudiar la relación entre factores psicológicos e inmunidad, y la relación entre estos factores y la aparición y progreso de enfermedades mediadas por el SI.

Para que se produzca la enfermedad no basta con la invasión del organismo por parte del agente invasor. Debe darse que las defensas sean incapaces de mantener dicho agente inactivo o eliminarlo. Es de esta forma como las variables psicológicas que afectan la inmunidad pueden influir en la aparición, curso y desenlace de diversas enfermedades. No se conoce de qué tipo y magnitud deben ser los cambios producidos para que se vea alterada la posibilidad de defensa del organismo.

Los factores psicológicos pueden alterar la inmunidad e incrementar la susceptibilidad a contraer enfermedades (Ray, 2004; Atanackovic y col., 2002; Marsland y col., 2002). Los cambios de conducta, asociados a características de personalidad, a procesos de adaptación o de afrontamiento frente a situaciones estresantes, o estados emocionales negativos también pueden alterar la inmunidad. Por ejemplo: una persona ante problemas emocionales puede fumar, alimentarse de forma inadecuada o ver alterado su patrón de sueño, lo cual puede tener consecuencias inmunosupresoras.

Entre los factores psicológicos más importantes que pueden influenciar la respuesta inmune adquiere especial importancia el estrés. Estrés es un concepto científico que se refiere a la respuesta inespecífica del organismo frente a cualquier demanda, en la cual la capacidad de adaptación individual constituye el factor más importante y que puede definirse como un conjunto de eventos que comienza con un estímulo (estresor). Este estímulo es percibido por el cerebro y precipita una reacción de este órgano desencadenando una respuesta fisiológica. La respuesta fisiológica al estrés se compone de elementos cognitivos emocionales que por mecanismos neuroendocrinos y conductuales influyen en el SI.

En los últimos años muchos estudios realizados tanto en humanos como en animales han sugerido que el estrés ejerce un profundo efecto sobre la función del SI (McEwen, 1998; Padgett y Glaser, 2003; Glaser, 2005). El impacto de un estresor sobre la respuesta inmune depende de una variedad de factores tales como la duración y tipo de estresor, así como también del tipo de respuesta inmunológica evaluada. Se han descrito alteraciones inmunológicas asociadas al estrés y a enfermedades psiquiátricas, particularmente a la depresión mayor (Maes, 1995; Miller, 1998; Gladkevich y col., 2004; Leonard, 2000).

Entre las disfunciones inmunológicas más importantes inducidas por el estrés pueden mencionarse: la disminución en la proliferación linfocitaria inducida por mitógenos (Freire-Garabal y col., 1997), el incremento en la reactivación viral de virus como el de Epstein-Barr, el Herpes simplex y el Citomegalovirus (Bonneau y col., 1998; Rozlog y col., 1999), la desregulación de la producción de citoquinas liberadas por células TH tipo 1 y 2 (Elenkov y col., 2005), una disminución de la actividad de células NK (Whiteside y Herberman, 1994). Asimismo, el estrés ha sido involucrado en el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Heesen y col., 2005; Chida y col., 2005), alergias (Lonne-Rahm y col., 2004), cáncer (Reiche y col., 2004) y envejecimiento (Bauer, 2005; Miller y O'Callaghan, 2005).

## **5- ESTRÉS Y DEPRESIÓN**

La depresión es un complejo desorden psicológico definido por el DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) como un trastorno que se caracteriza por la presencia de al menos dos síntomas cardinales: la pérdida de placer (anhedonia) y el ánimo decaído. Estos síntomas están asociados con alteraciones adicionales que incluyen tanto síntomas psicológicos (sentimientos de desesperanza o culpa, pérdida de concentración o indecisión, pensamientos recurrentes de muerte o suicidio) como síntomas somático/neurovegetativos (cambios en el apetito y/o el peso; alteraciones del sueño; fatiga o pérdida de energía; agitación o reducción psicomotora) (American Psychiatric Association, 1994).

La respuesta al estrés tiene dos efectores principales, el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y el sistema nervioso simpático (SNS). Ambos efectores también parecen jugar un papel destacado en la depresión (Joels y col., 2004; Tichomirowa y col., 2005). En efecto, en la depresión se ha identificado una activación mantenida del sistema nervioso simpático y la hipercortisolemia ha sido una de las señales biológicas más reproducibles, aunque no es ni específica ni universal (Wong y col., 2000). La caracterización bioquímica de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y diversos hallazgos clínicos en relación con ella refuerzan la hipótesis de que, en la depresión, la hipercortisolemia es el resultado de un aumento en la actividad CRH. En subtipos de depresión con características atípicas como fatiga, hipersomnio e hiperfagia, la desregulación parece ser de signo opuesto, con una disminución de la actividad CRH y, secundariamente, la disminución de la función del eje HPA. En todo caso, hay que mencionar que la naturaleza de la asociación entre estrés y depresión es un área objeto de intenso debate (Chrousos y Gold, 1992).

También se han descrito, en relación con la depresión, disfunciones en la hormona del crecimiento (Zenker y col., 2002), el eje tiroideo (Tichomirowa y col., 2005), los receptores de

sustancias opioides endógenas (Matussek, 2003), los aminoácidos neurotransmisores (en especial, el GABA) (García-Alloza y col., 2005); y la sustancia P (Deuschle y col., 2005)

Estudios realizados durante los últimos 10 años han demostrado que los desórdenes anímicos y el estrés están acompañados por alteraciones estructurales en el cerebro. Estas alteraciones incluyen cambios en la duración y número de procesos neuronales, número de neuronas y glia e incluso variaciones en la tasa de neurogénesis que son reversibles con tratamientos antidepresivos (Duman, 2002). El hipocampo es una estructura cerebral plástica que expresa altos niveles de receptores para esteroides adrenales y está involucrada en ciertos tipos de aprendizaje y memoria. También es una estructura vulnerable a los efectos del estrés y el trauma (McEwen, 2005) y a sufrir atrofia en desórdenes como la esquizofrenia (Bogerts y col., 1993; Razi y col., 1999), la depresión mayor (MDD) (MacQueen y col., 2003; Frodl y col., 2002), el desorden bipolar (Beyer y Krishnan, 2002) y el estrés post-traumático (Bremner y col., 1995). En modelos animales de estrés crónico y agudo, las neuronas del hipocampo y la corteza prefrontal responden a la repetición del estrés mostrando atrofia neuronal que lleva a la pérdida de memoria. Las reducciones observadas en el volumen del hipocampo serían el resultado de un proceso de remodelación que incluye la retracción de dendritas, la disminución de la neurogénesis en el giro dentado y la pérdida de células gliales (Czeh y col., 2001; Magarinos y col., 1999; McEwen, 1999). Algunos factores implicados en esta remodelación celular incluyen la elevación de los niveles de GCs inducida por estrés que están involucrados en la disminución de la neurogénesis (Cameron y McKay, 1999) y la inducción del arresto del ciclo celular en células periféricas (Rogatsky y col., 1997). La desregulación de la secreción de GCs, producto de la alteración que sufre el eje HPA durante períodos de estrés, junto con la actividad aumentada de aminoácidos neurotransmisores excitatorios, podría resultar tanto en una potencial remodelación reversible como en la muerte irreversible de células del hipocampo de pacientes con depresión (Sapolsky, 2000). Sin embargo, estudios recientes usando metodología estereotáxica no han podido demostrar pérdida celular en el hipocampo inducida por corticosteroides en condiciones de estrés, si no cambios adaptativos y reversibles en parámetros estructurales luego de la exposición a estrés (Suaba y col., 2005).

La denominada hipótesis de las aminas biógenas postulaba a mediados de los años sesenta que la depresión refleja un desequilibrio en las concentraciones de aminas biógenas (principalmente, noradrenalina y serotonina) en el sistema nervioso central. Estas conclusiones se basaban en observaciones que mostraban que diversos fármacos antidepresivos aumentaban las concentraciones sinápticas de noradrenalina o serotonina y que la reserpina, un fármaco que disminuye drásticamente las concentraciones de noradrenalina, podía causar síntomas similares a la depresión.

La enorme repercusión que los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (IRSS), como la fluoxetina, han tenido en el tratamiento de la depresión en los últimos decenios ha

contribuido a convertir a la serotonina en el neurotransmisor más asociado a este trastorno. Aunque los actuales antidepresivos serotoninérgicos actúan básicamente bloqueando la recaptación de este neurotransmisor, la identificación de múltiples subtipos de receptores serotoninérgicos ha incrementado el interés de la comunidad científica en la identificación y el desarrollo de nuevos agentes serotoninérgicos antidepresivos cada vez más específicos (Kent, 2000; Blier y Ward, 2003). Si bien la noradrenalina y la serotonina son las aminas biógenas que más se han asociado a la fisiopatología de la depresión, también la dopamina podría desempeñar un papel en este trastorno. De hecho, la actividad dopaminérgica podría estar disminuida en la depresión, pues los fármacos y enfermedades que reducen su concentración se han relacionado con síntomas depresivos y, por el contrario, los fármacos que incrementan las concentraciones de dopamina reducen la sintomatología depresiva.

## **6-CITOQUINAS Y DEPRESIÓN.**

Desde el descubrimiento de las CQs pro-inflamatorias muchos reportes han mostrado que la administración de estas moléculas a animales y a voluntarios humanos inducen síntomas de depresión incluyendo ánimo decaído, anhedonia, supresión de ingesta, retardo psicomotor, anormalidades en el sueño, fatiga, confusión y alteraciones cognitivas. También se ha reportado la capacidad de las CQs de activar el eje HPA, un hecho frecuentemente descrito en la depresión. (Capuron y Dantzer, 2003). Sin embargo, no había evidencia de que esta patología estuviera asociada a la activación del SI. Por el contrario, predominaba la asociación entre el paciente deprimido con el estado de inmunosupresión como se evidenciaba por la reducida actividad de células NK y la disminuída respuesta proliferativa de linfocitos ante mitógenos (Irwin, 1999). Tomó varios años recolectar datos suficientes para aceptar la posibilidad de que la depresión estuviera asociada no sólo a un estado de inmunosupresión sino a un desequilibrio en la función inmune caracterizada por la activación de la respuesta monocito/macrófago y la inhibición relativa de la función linfocitaria. Maes (1995) fue el primero en evidenciar una activación inmune en pacientes deprimidos y se basó principalmente en la medida de proteínas de la fase aguda y de CQs en plasma de pacientes con depresión mayor y resistentes al tratamiento de la misma.

La posibilidad de que las CQs estén involucradas en la patogénesis de la depresión y de otras enfermedades psiquiátricas ha sido examinada desde varios ángulos. La inmunopsiquiatría es una incipiente rama de la medicina cuyo fin es el estudio de los mecanismos inmunológicos involucrados en la fisiopatología de los desórdenes psiquiátricos. Dentro de este contexto, desbalances en la producción de CQs tipo TH1 (IFN- $\gamma$ , IL-12,, IL-2, IL-18, TNF $\alpha/\beta$ ) y TH2 (IL-4, IL-13, IL-10, IL-6, IL-5, IL-3) han sido sugeridos en la esquizofrenia, la depresión mayor y la

enfermedad de Alzheimer (Schwarz y col., 2001). Específicamente, en la depresión mayor se ha postulado que el predominio de una u otra respuesta (TH1 o TH2) podría estar relacionado a variables clínicas distinguiendo entre individuos suicidas y no suicidas (Mendlovic y col., 1999). Se ha postulado la existencia de una relación entre la producción de IFN- $\gamma$  (TH1), el metabolismo del triptofano, la deficiencia de serotonina a nivel de SNC y la tendencia al suicidio. Por otra parte, los pacientes deprimidos sin tendencia suicida presentarían elevados niveles de IL-6 (TH2) y sufrirían una deficiencia de noradrenalina. Es importante tener en cuenta que estas CQs tienen la capacidad de actuar a nivel del SNC produciendo cambios en el comportamiento y que además han sido implicadas en procesos de inflamación y degeneración neuronal (Larson y Dunn, 2001).

## **7- TIEMPOS MODERNOS**

Dada la elevada prevalencia de la depresión en la sociedad occidental actual, los costos económicos, directos e indirectos, de esta patología son elevadísimos. Debido a los elevados costos personales, sociales y sanitarios que conlleva, estos cuadros han adquirido una importancia notable en todos los programas de prevención y gestión de la salud. En muchas especialidades (gastroenterología, medicina familiar, endocrinología, cardiología, etc.), la depresión alcanza el 20-25% de las consultas, dato que revaloriza la importancia del conocimiento de esta enfermedad para cualquier médico.

La Depresión constituye una patología que afecta al 10% de la población adulta en edad productiva. Según un informe de la Organización Mundial de la Salud, se prevé que en el año 2020 será la primera causa de ausentismo laboral a nivel mundial. En Argentina, el 25% de la población adulta sufre patologías vinculadas con la salud mental siendo la depresión la más frecuente. Por otra parte, es un proceso crónico que provoca sufrimiento y un estado de incapacidad en la persona que afecta notablemente su entorno social.

## **8- MODELOS ANIMALES DE DEPRESIÓN**

Las alteraciones inmunológicas asociadas a enfermedades psiquiátricas son difíciles de interpretar debido a la heterogeneidad de la muestra de pacientes y a variables como ser la edad, el sexo y el estado de hospitalización. Estudios realizados en animales usando modelos de depresión permiten obtener resultados más homogéneos y consistentes. Estos modelos de depresión involucran la aplicación de varios estresores e inducen un estado similar al observado durante la depresión en humanos.

De acuerdo a la clasificación del DSM-IV, el diagnóstico de la depresión mayor requiere un período de 2 semanas de ánimo decaído o pérdida de interés o placer (anhedonia). El ánimo decaído no puede ser evaluado en un modelo animal pero el estado anhedónico, así como alteraciones en el comportamiento sí.

Varios paradigmas del estrés crónico han sido ampliamente usados en estudios preclínicos como el estrés psicosocial en el primate primitivo *Tupaia belangeri* (Fuchs y Flugge, 2002) y el estrés físico, social e impredecible en roedores (Alonso y col., 2004; Blanchard y col., 2001; McEwen, 2001). Entre estos, el modelo de estrés crónico moderado (CMS) es un modelo validado de depresión interesante ya que el cuadro depresivo surge como consecuencia de la exposición a una serie de estresores considerados moderados que se aplican de manera crónica, secuencial y alternada para no producir acostumbamiento por parte del animal. Willner (1992) ha definido este modelo como un modelo realista y válido de depresión dado que:

- tiene validez predictiva (los cambios comportamentales pueden ser revertidos con el tratamiento crónico con una amplia variedad de antidepresivos)
- casi todos los síntomas de la depresión han sido demostrados
- la exposición al modelo causa una disminución generalizada de la respuesta ante un estímulo lo cual es comparable al estado anhedónico, síntoma fundamental de la depresión.

Es importante tener en cuenta que la sensibilidad a este modelo puede variar de acuerdo a la cepa utilizada e inclusive al proveedor de los animales. Por otra parte, los cambios conductuales que se manifiestan en los animales sometidos al modelo pueden diferir entre laboratorios debido a diferencias mínimas en la implementación del modelo. (Willner, 1997 a y b).

## **HIPÓTESIS**

---

## **OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES**

---

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La depresión es un trastorno crónico que, tanto en su aparición como en sus episodios sucesivos, está influenciado por factores ambientales externos. Entre estos factores se encuentra el estrés. Así, postulamos que el estrés crónico promueve alteraciones inmunológicas que quiebran el equilibrio TH1/TH2 participando en la inducción de variaciones neuroquímicas a nivel del sistema nervioso central y que están involucradas en la aparición de los cambios conductuales observados en esta patología.

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **Objetivos Generales:**

El objetivo principal del presente trabajo es estudiar la correlación existente entre el estrés, las alteraciones inmunológicas, la desregulación del balance TH1 y TH2 y las alteraciones conductuales observadas en un modelo de depresión inducido por exposición crónica a factores moderados de estrés. Además, evaluar su relación con la presencia de alteraciones morfológicas y neuroquímicas en algunas de las estructuras cerebrales asociadas al comportamiento.

Por ser un modelo realista de depresión, para estudiar las alteraciones de las respuestas neuroinmunes inducidas por el estrés y sus consecuencias fisiopatológicas, se ha elegido el modelo de estrés crónico moderado.

### **Objetivos Particulares**

- a) Caracterizar el modelo de estrés crónico moderado adaptado en nuestro laboratorio desde el punto de vista conductual analizando la actividad locomotora, y la capacidad de aprendizaje y memoria.
- b) Investigar cambios en la respuesta inmune humoral y celular y las señales intracelulares asociadas.
- c) Estudiar el eje hipofisario-adrenal investigando la participación de las hormonas clásicamente asociadas al mantenimiento de la homeostasis bajo condiciones de estrés crónico (catecolaminas y corticosterona).
- d) Investigar cambios en el balance TH1/TH2.
- e) Evaluar la presencia de alteraciones neuroanatómicas y neuroquímicas en una de las estructuras cerebrales clásicamente asociadas al comportamiento (hipocampo).
- f) Evaluar la presencia de cambios conductuales y morfológicos inducidos por administración de interleuquinas.

## MATERIALES y MÉTODOS

---



## **1- ANIMALES**

Se utilizaron ratones hembra endocriados de la cepa BALB/c (edad: 2 meses, peso promedio: 25 mg) mantenidos, a menos que se indique, bajo condiciones de temperatura (23°C-25°C) y ciclos de luz-oscuridad (14 hs luz, 10 hs oscuridad) constantes en el bioterio del Instituto.

## **2- MODELO DE ESTRÉS CRÓNICO MODERADO (CMS)**

### **2-1 MODELO ANIMAL DE ESTRÉS**

Se utilizó el modelo de estrés crónico moderado desarrollado por Willner y col. (1992) en rata y modificado por Monleón para ratón (Monleón, 1995). Se ubicó un ratón por jaula, manteniéndose un ciclo de luz-oscuridad de 12 hs. Excepto en casos en que se aclare, el agua y la comida estuvieron libremente disponibles.

El régimen consistió en: 3 períodos de 3 hs de privación de agua y comida, inmediatamente anterior al test de sucrosa; 2 períodos de 20 hs de privación de agua y comida; 1 período de 16 hs de privación de agua; 2 períodos de iluminación nocturna continua (14 hs); 2 períodos (7 y 17 hs) con la jaula inclinada a 45°, 1 período de 17 hs compartiendo la jaula con otro ratón, teniendo la precaución de poner juntos siempre a los mismos ratones y alternando entre la jaula de uno u otro; 1 período de 17 hs durante el cual el ratón permanece con el aserrín de su jaula mojado con 200 ml de agua. El tipo de estresores utilizados es considerado moderado y se aplicaron de manera crónica, secuencial e impredecible. Así, se evita producir acostumbamiento por parte del animal.

### **2-2 TEST DE CONSUMO DE SACAROSA**

La primer fase del experimento consistió en entrenar a los ratones para consumir una solución de sacarosa al 1% durante 2 semanas. Los tests se realizaron tres veces por semana, a la misma hora, inmediatamente después de privar a los ratones de agua y comida durante tres horas. Una vez terminada esta fase, se dividió a los ratones en dos grupos.

Un grupo fue sometido al régimen de estrés (CMS) y otro fue utilizado como control (C).

El consumo de sacarosa fue monitoreado durante todo el experimento pesando la botella con la solución antes y después del período en que los animales tuvieron acceso a la misma.

### **2-3 DETERMINACIÓN DEL PESO CORPORAL**

Se controló el peso de los animales tres veces por semana a la misma hora.

### **2-4 REVERSIÓN CON ANTIDEPRESIVOS**

A fin de validar nuestro modelo de depresión, se evaluó la reversión de los parámetros arriba mencionados tras la administración oral de 15 mg/kg/día de una solución fresca de tianeptina (Servier, Neuilly sur Seine, France), seis veces por semanas durante 4 semanas a animales CMS. El grupo control fue tratado con el mismo esquema pero recibió vehículo.

## **3- ESTUDIOS DEL COMPORTAMIENTO ANIMAL**

### **3-1 TEST DE “CAMPO ABIERTO” (OPEN FIELD)**

La observación de la actividad exploratoria en un campo abierto permite conocer si un determinado tratamiento tiene algún efecto en la respuesta a un entorno novedoso evaluando la actividad motora. Ratones control y sometidos al esquema de estrés crónico fueron colocados en el centro de una caja acrílica rectangular (42 x35 x15 cm) dividida uniformemente en 30 cuadrados de 7x7 cm. (Figura 9). La superficie total fue dividida en cuatro cuadrantes iguales. Dos observadores, que desconocen el grupo al que pertenecen los animales, registraron los parámetros a evaluar durante 10 minutos, siempre entre las 14 PM y las 17 PM. La conducta exploratoria involucró olfateo y orientación general en toda la superficie de la caja. La exploración que se da dentro de un dado cuadrante por 5 o más segundos consecutivos fue definida como “exploración no ambulatoria”. Cuando la exploración ocurrió en dos o más cuadrantes por cinco segundos consecutivos fue definida como “exploración ambulatoria”. También se evaluó la actividad locomotora definida como el número de líneas cruzadas y las exploraciones verticales (rearing) definidas como el número de veces que el animal se para sobre sus patas traseras.

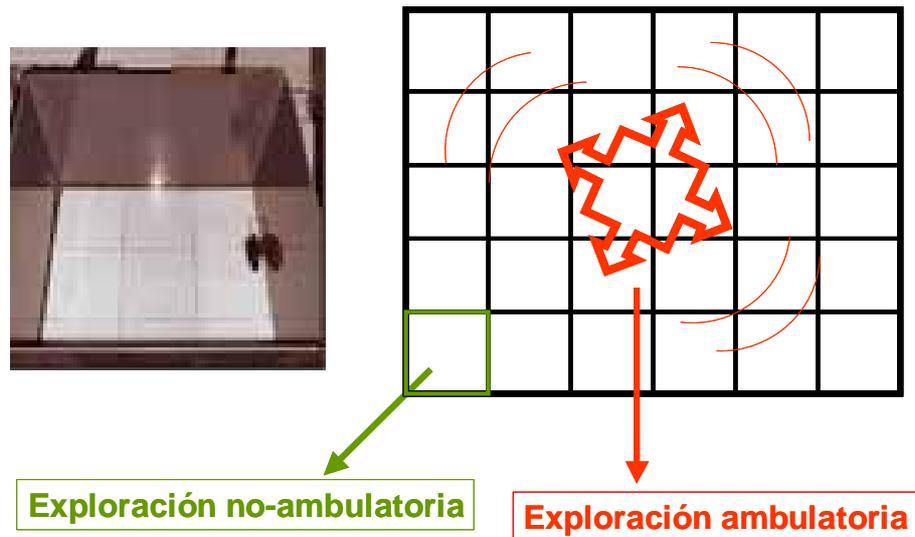


Figura 9: Esquema de la caja acrílica utilizada en el test de campo abierto

### 3-3 TEST DE EVITACIÓN INHIBITORIA

Este estudio se realizó entre las 14 AM y las 17 PM todos los días. El aparato utilizado en este estudio consiste en dos compartimentos de iguales dimensiones, uno iluminado por una lámpara de 60 W y otro oscuro, divididos por una abertura (80x80 mm). El piso está conformado por una grilla de varillas metálicas y las del compartimento oscuro están electrificadas. El aparato está conectado a una computadora que permite regular la duración e intensidad de la descarga eléctrica.

La conducta instintiva de los roedores, animales con hábitos nocturnos, hace que prefieran los ambientes oscuros o poco iluminados. Por lo tanto, si el animal es colocado en el compartimento iluminado tenderá a pasar a la zona oscura. Cuando el animal entra con sus 4 patas al compartimento oscuro recibe una descarga de 0.5 mA durante 3 segundos. El estímulo aversivo produce una modificación en la conducta exploratoria y contribuye al aprendizaje, ya que si el animal es expuesto nuevamente a la situación, se espera que permanezca más tiempo en el área iluminada para evitar la descarga eléctrica asociada con el área oscura. Este test supone una situación de conflicto: ambos compartimentos tienen características aversivas. Sin embargo, la descarga eléctrica es considerada un estímulo más aversivo que la luz por lo que se espera que, bajo condiciones normales, el animal tienda a inhibir su tendencia innata a permanecer en lugares oscuros. Los animales fueron colocados en el compartimento iluminado y se registró el tiempo que transcurrió hasta que el animal ingresó con sus 4 patas al área oscura (latencia de entrenamiento) donde se aplicó la descarga eléctrica. El

animal puede escapar de la descarga eléctrica volviendo al compartimento iluminado. Los animales permanecieron en sus jaulas hasta que se realizó el segundo ensayo.

Luego de 24 hs, se repitió el procedimiento. El ratón fue colocado nuevamente en la zona iluminada del aparato y se registró el tiempo que tardó en entrar en la zona oscura (latencia del test). La latencia del animal que no entró en el compartimento oscuro por más de 5 minutos fue calculada como de 300 segundos.

Este procedimiento mide la capacidad de evocación de un aprendizaje o una memoria adquirida. Los pasos previos a dicha evocación son la adquisición y la consolidación. Cualquier fenómeno que interfiera en estos momentos del aprendizaje puede modificar la memoria evocada.

#### **4- EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN ESTRUCTURAS CEREBRALES.**

##### **4-1 HISTOLOGÍA DE LAS ZONAS CA1 Y CA3 DE HIPOCAMPO**

Luego de perfundir y fijar al animal con paraformaldehído 4% el cerebro fue incluido en parafina. Se realizaron cortes coronales de 10  $\mu\text{m}$  con micrótopo tipo Minot, se desparafinizaron con tolueno, se hidrataron con concentraciones decrecientes de etanol y finalmente con agua destilada. Se coloreó con violeta de cresilo durante 2 minutos y se decoloraron parcialmente con alcohol 50 y 70%. Se seleccionaron cortes de la zona de interés. Los cortes se observaron y fotografiaron en un microscopio Axiphot Carl Zeiss usándose una máquina fotográfica digital Nikon de 4,5 megapíxeles. Se evaluó el espesor de las zonas CA1 y CA3 utilizando el software Image Pro versión 4.5.

##### **4-2 TINCIÓN CON EL COLORANTE DE HOESCHT**

Se observó la morfología nuclear de las células hipocámpales con colorante de Hoechst 33342. Una vez fijado el tejido, se incubó 15 minutos en oscuridad con solución de Hoechst diluido 1:10 en PBS y se lavó con PBS dos veces. Los núcleos celulares ya fijados y teñidos fueron observados con un microscopio de fluorescencia Axiphot Carl Zeiss y se fotografiaron con una máquina fotográfica digital Nikon de 4,5 megapíxeles.

## 5- EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

### 5-1 OBTENCIÓN DE LINFOCITOS

Se obtuvieron linfocitos a partir de los órganos linfáticos (ganglios y bazo) por técnicas descritas anteriormente (Ayelli-Edgar et al., 2002). Brevemente, los órganos linfáticos fueron removidos y disgregados a través de un filtro de metal de 1 mm. La suspensión celular fue filtrada a través de un filtro de nylon de 10 mm y depletada de células no linfoides luego de centrifugación en Ficoll/Hypaque. Luego de tres lavados en RPMI 1640, las células fueron resuspendidas en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) no estimulante, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml. La viabilidad celular fue estimada de acuerdo al criterio de exclusión de Azul tripán y fue mayor del 90%.

Cuando fue necesario se purificaron LT de ganglios y LB de bazo. Las poblaciones enriquecidas en LT fueron obtenidas por pasaje de la suspensión celular a través de una columna de lana de vidrio de acuerdo al método de Julius et al. (1973). Brevemente, se lavó la lana de nylon (Fenwal Laboratories, Deerfield, IL), se peinó y se pesaron 0.5 g que se introdujeron en jeringas de 10 ml a modo de columna alcanzado 6 cm de altura. La columna se hidrató homogéneamente sin que quedaran burbujas con PBS con 5% de SFB, se lavó con 20 ml del PBS suplementado y se estabilizó incubándose durante 45 min a 37°C. Transcurrido este tiempo se sembró la suspensión celular en PBS con 5% de SFB y se incubó nuevamente 45 min a 37°C. Finalmente, se eluyó la columna con 10 ml de PBS suplementado. La población obtenida se centrifugó 10 min a 200 x g y se resuspendió en el medio adecuado.

Las poblaciones enriquecidas en LB fueron obtenidas a partir de la suspensión esplénica lisando los glóbulos rojos con 1 ml de agua destilada durante 15 seg y posterior lavado por centrifugación con RPMI suplementado. Luego se eliminaron las células T por tratamiento con Ac anti-Thy 1.2 diluido 1:1000 durante 30 min a 4°C y 30 min más a 37°C en presencia de complemento de cobayo. Se lavaron las células y se realizó una adherencia al plástico durante 2 horas a fin de eliminar células adherentes (Bruce, 1981). Finalmente se centrifugaron a 200 x g durante 10 min y el sedimento fue resuspendido en el medio adecuado.

La pureza de ambas poblaciones fue analizada por ensayos de inmunofluorescencia utilizando el Ac adecuado y resultó ser mayor del 95%.

## 5-2 DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Los linfocitos fueron cultivados *in vitro* en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado a razón de  $1 \times 10^5$  células por pocillo en alícuotas por triplicado de 150  $\mu$ l en placas de 96 pocillos. Se realizaron curvas concentración-respuesta y se siguió la cinética de proliferación para cada mitógeno. Se adicionaron 50  $\mu$ l de lectinas mitogénicas de células T -concanavalina A (Con A), fitohemaglutinina (PHA)- y de células B (LPS) alcanzando una concentración final de: Con A: 0.5, 1, 2, 4  $\mu$ g/ml; PHA: 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/ml; LPS: 15, 30, 60, 75, 100  $\mu$ g/ml. El control se realizó agregando 50  $\mu$ l de medio de cultivo. La actividad mitogénica se determinó por incorporación de 1  $\mu$ Ci de  $^3$ H-timidina (actividad específica 25 Ci/mmol) durante las últimas 18 horas de cultivo. Finalizado este período se retuvo la fase macromolecular insoluble en ácido en papeles de filtro GF/C según protocolos ya descritos (Genaro y Boscá, 1993). Se colocaron los filtros en solución centelladora (Amersham Pharmacia) y se determinó la actividad (dpm) en un contador centelleo líquido. Para cada concentración de las lectinas se calculó la media de cada triplicado. Las células estimuladas mitogénicamente mostraron una cinética de proliferación esperada con un pico al tercer día de cultivo.

## 5-3 INMUNIZACIONES *IN VIVO*

Glóbulos rojos de carnero (GRC, 2,5 % en solución salina) fueron usados como inmunógenos para evaluar la respuesta humoral T-dependiente y lipopolisacáridos bacterianos (LPS) para determinar la respuesta humoral T-independiente.

Para la respuesta a GRC, los ratones fueron inmunizados intraperitonealmente (i.p.) en el día 0 y recibieron un refuerzo en el día 11. Se obtuvieron muestras de sangre para la determinación de Acs al día 10 (respuesta primaria) y al día 18 (respuesta secundaria). Para LPS, cada animal recibió una inyección i.p. de 10  $\mu$ g del Ag (LPS en 0.1 ml de solución salina) y las muestras de sangre fueron obtenidas al día 10. Ratones inyectados con vehículo fueron usados como control (Figura 10).

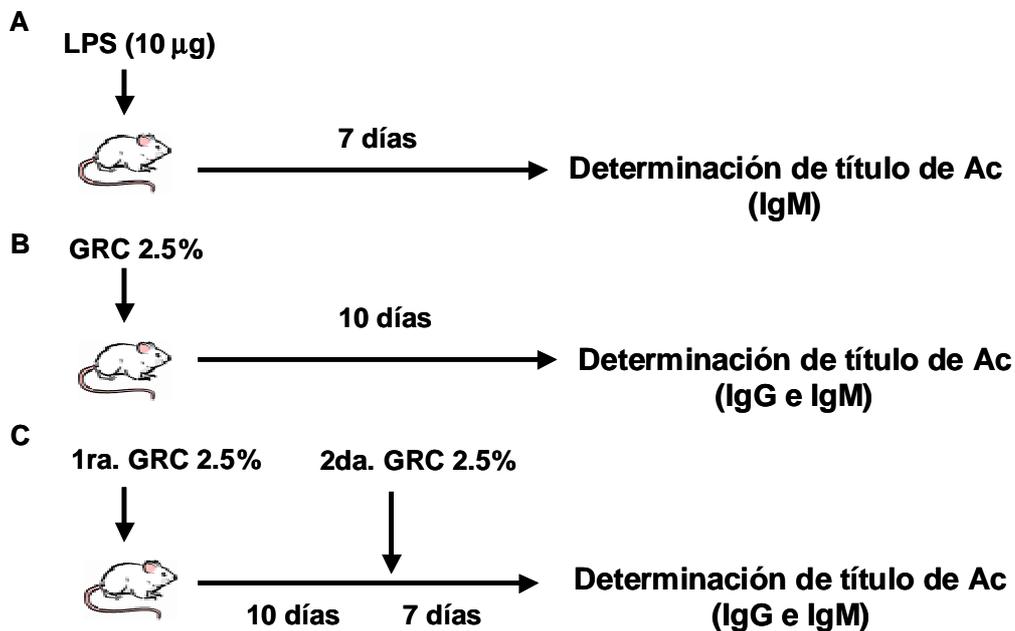


Figura 10: Esquema de inmunización para evaluar respuesta primaria (A y B) y secundaria (C)

#### 5-4 DOSAJE DE ANTICUERPOS

Se obtuvo suero proveniente de sangre extraída por punción retroorbital que se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del ensayo. Se realizó un ensayo inmuno (ELISA) para determinar Ac específicos contra GRC y contra LPS. Brevemente, placas de 96 pocillos (Maxisorp immunoplates, Nunc) fueron cubiertas con membranas de GRC ( $10\ \mu\text{g/ml}$ ) o LPS ( $2\ \mu\text{g/ml}$ ) y se incubaron durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se agregaron distintas diluciones del suero y se incubaron durante 2 hs a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y las muestras se incubaron con Ac tipo IgG obtenido en cabra anti-IgG o anti-IgM de ratón conjugado con fosfatasa alcalina. Se utilizó p-nitrofenilfosfatasa como sustrato para desarrollar color. La lectura se realizó a 405 nm en un lector de placas (BIORAD 3550).

Las reacciones fueron consideradas positivas cuando los valores de densidad óptica (DO) fueron mayores que el valor medio más 2 desvíos estándar del suero normal (suero de animales no inmunizados o inyectados con vehículo que no dan diferencias significativas entre ellos).

## 6- DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se determinaron las poblaciones de linfocitos CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>/ CD8<sup>+</sup> en suspensiones celulares por citometría de flujo. Brevemente, se colorearon alícuotas de suspensiones celulares con Ac CD4 anti-ratón conjugado con fluoresceína o con Ac monoclonal CD8 conjugado con ficoeritrina. Los linfocitos fueron identificados por citometría de flujo usando un citómetro de flujo (Becton Dickinson) con amplificación log y un programa FACScan research. Se usaron isotipos control (IgG1-FITC/IgG2a-PE) en cada ensayo para determinar el coloreado no específico.

## 7- ESTUDIO DE LAS SEÑALES INTRACELULARES TEMPRANAS

### 7-1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CA<sup>2+</sup> INTRACELULAR

A fin de determinar la concentración de Ca<sup>2+</sup> se utilizó un quelante del calcio intracelular que fluoresce al unirse al calcio: FURA 2-AM (forma química que pasa la membrana celular). Se incubaron los linfocitos con el FURA 2-AM (concentración final 5µM) a 37°C por 10 min en presencia de 20 µg/ml de plurónico (para favorecer la dispersión del fluorocromo) como fuera descrito previamente por Cobbold y Rink (1987). Tras lavar y centrifugar (200 x g por 10 min) dos veces en PBS, las células fueron transferidas a PBS conteniendo 5 mg/ml de BSA libre de ácidos grasos. La fluorescencia fue registrada a 510 nm en un espectrofluórometro Amico Bowman Spectronic usando una fuente de excitación de 340 o 380 nm. La fluorescencia máxima fue determinada al final del ensayo agregando 10 µl de SDS 10%. La fluorescencia mínima fue determinada agregando 15 µl de una solución conteniendo 0.5 M EGTA, pH 9.0. La [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> intracelular fue calculada según la intensidad de fluorescencia del FURA 2-AM de acuerdo a Cobbold y Rink (1987) como:  $[Ca^{2+}]_i = Kd (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ , donde Kd= 224 nM para el colorante intracelular.

### 7-2 PURIFICACIÓN DE PKC

Tras la estimulación mitogénica la suspensión linfocitaria (10<sup>7</sup> células/ml) fue inmediatamente centrifugada (5000 X g por 30 s) y los sedimentos fueron congelados en N<sub>2</sub> líquido. La homogeneización fue realizada en 2 ml de medio frío conteniendo 20mM HEPES (pH 7.4), 10 mM β-mercaptoetanol, 2 mM EGTA, 2mM EDTA , 1mM PMSF (para metilsulfonil fluorouro), 10 µg/ml leupeptina. A los fines de medir la distribución de la actividad de PKC se separaron la fracción soluble

o citosólica y la particulada o unida a membrana. A tal fin, el homogenato se centrifugó a 300 x g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante constituye la fracción soluble.

El sedimento se resuspendió en 0,25 ml de medio de homogeneización con 0,2% del detergente no iónico, Nonidet P-40, a fin de extraer la enzima de las membranas. Esta fracción se mantuvo en hielo durante 30 min y después de añadir 0,25 ml más de medio sin detergente, se centrifugó en las condiciones anteriormente indicadas. El sobrenadante obtenido contiene la actividad de PKC correspondiente a la fracción particulada. La PKC fue purificada por filtrado a través de columnas de DE 52 (3.5 x 0.5 cm). La enzima fue eluída en un buffer conteniendo 120 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.5 mM EGTA y 10 mM HEPES, pH 7.4.

### **7-3 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE PKC**

Para medir la actividad de la enzima purificada de las fracciones subcelulares linfocitarias se determinó la capacidad de fosforilar la histona H1. Ambas fracciones, citosólica y particulada, fueron sometidas a ensayo con  $^{32}\text{P}$ -ATP a 37°C durante 30 min y luego se detuvo la reacción con ácido tricloroacético (TCA) 5% con 10mM de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). El precipitado macromolecular se retuvo en papel Whatman GF/A. El papel se colocó en un vial con solución centelladora (Amersham Pharmacia) y se determinó la radioactividad por centelleo líquido (Genaro y Boscá, 1993). La actividad correspondiente a otras quinasas se determinó en ausencia de fosfatidilserina y  $\text{Ca}^{2+}$  y en presencia de EGTA (0.5 mM). La actividad de PKC fue calculada como la diferencia entre la actividad total y la actividad de otras quinasas. En algunos experimentos se utilizó el péptido sintético de la proteína básica de la mielina (MBP 4-14, Gibco BRL, Life Technology), un conocido sustrato específico de PKC (Yasuda y col., 1990), siguiendo las indicaciones del sistema de ensayo para PKC de Gibco. En este caso, la especificidad de PKC fue confirmada usando un péptido inhibidor pseudosustrato de la enzima (19-36) provisto por Gibco. La eficiencia de la actividad de PKC fue de 85-90% de la actividad quinasa total.

### **7-4 CUANTIFICACIÓN PROTÉICA**

La concentración de proteínas fue determinada en cada fracción por el método de Bradford (Bio-Rad) (Bradford, 1976).

## 7-5 IMMUNOBLOT DE PKC

Las fracciones citosólicas y particuladas de células estimuladas y no estimuladas provenientes de animales control y CMS fueron suplementadas con buffer 3X SDS (2% SDS, 10% (v/v) glicerol, 62.5 mM Tris-HCl, pH=6.8, 0.2% azul de bromofenol, 1% (v/v) 2-mercaptoetanol). Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Los sitios de pegado inespecíficos fueron bloqueados con buffer de bloqueo (5% leche descremada, conteniendo 0.1% Tween-20 en 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 y 0.9% NaCl) por 1 h. Las membranas fueron subsecuentemente incubadas con Ac anti las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\theta$  (dil 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology Inc.) por 18 hs. Los controles negativos fueron incubados en presencia del péptido bloqueante correspondiente (2  $\mu$ g/ml de Ac cada 1  $\mu$ g/ml de péptido). Luego las membranas fueron incubadas con Ac monoclonal anti-IgG de conejo (dil 1:5000) conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA Chemical Co.) por 1 h. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas usando Nitroblue tetrazolium (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP). Como indicador de peso molecular se utilizó un marcador de amplio rango (Full Range Rainbow, Amersham Pharmacia). El control de carga se realizó utilizando un Ac anti- $\beta$ -actina, dil 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

## 7-6 ACTIVIDAD de NF- $\kappa$ B

Para obtener las fracciones citosólicas y nucleares se utilizó el método de extracción previamente descrito por Schreiber et al. (1989). Los extractos citosólicos fueron usados para realizar ensayos de Western blot a fin de detectar la presencia o ausencia de I $\kappa$ -B por medio de un anticuerpo específico. Los extractos nucleares fueron sometidos a ensayos de movilidad electroforética en gel (EMSA) para determinar la translocación de NF- $\kappa$ B.

### 7-6-a OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES

Linfocitos T y B provenientes de animales control o CMS obtenidos según fuera descrito anteriormente, fueron estimulados durante 30 min con mitógenos selectivos: Con A (2  $\mu$ g/ml o PHA (25  $\mu$ g/ml) para células T y LPS (30  $\mu$ g/ml) para células B. Tras el período de estimulación, las células fueron centrifugadas y almacenadas a -80° hasta el momento del ensayo. Los sedimentos fueron homogeneizados en 200  $\mu$ l de buffer A (10 mmol/l HEPES; pH 7.9, 1 mmol/l EDTA, 1mmol/l EGTA, 10 mmol/l KCl, 1mmol/l DTT, 0.5 mmol/l fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF), 40  $\mu$ g/ml leupeptina, 2

$\mu\text{g/ml}$  tosil-lisil-clorometano (TLCK), 5 mmol/l NaF, 1 mmol/l  $\text{NaVO}_4$ , 10 mmol/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ) y Tritón al 0.5% (vol/vol). Después de 15 min a 4°C, se agitó fuertemente por 15 seg y se centrifugó a 8000xg por 15 min. Los núcleos fueron recolectados y los sobrenadantes (extractos citosólicos) almacenados a -80 °C. Los sedimentos fueron resuspendidos en 70  $\mu\text{l}$  buffer A suplementado con 20% (v/v) glicerol y 0.4 M KCl, y agitados por 30 min a 4°C. Las proteínas nucleares se obtuvieron por centrifugación a 13,000 rpm por 15 min y los sobrenadantes (extractos nucleares) fueron almacenados -80°C (Goren y col., 2004).

### **7-6-b ENSAYOS DE WESTERN BLOT**

Las muestras citosólicas fueron hervidas en buffer Laemmli por 5 min. Cantidades iguales de proteínas (15-30  $\mu\text{g}$ ) fueron separadas por SDS-PAGE 10%, transferidas a membranas Hybond P (Amersham) y, luego de bloquear con leche descremada al 5%, se determinaron los niveles de expresión de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ ,  $\text{I}\kappa\text{B-}\beta$  y  $\beta$ -actina (como indicador de igualdad de carga) usando Acs específicos (Santa Cruz, CA y Calbiochem, San Jose, CA). Las bandas obtenidas fueron visualizadas por quimiluminiscencia (ECL). Se realizaron diferentes tiempos de exposición para cada membrana para asegurar la linealidad de las intensidades de banda. Las intensidades de banda fueron medidas en un scanner densitométrico (Amersham) y expresadas en unidades arbitrarias.

### **7-6-c ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)**

Se marcaron sondas de oligonucleótidos conteniendo la secuencia consenso para NF- $\kappa\text{B}$  (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') usando un fragmento de la enzima Klenow en presencia de 50  $\mu\text{Ci}$  de [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP y los otros dNTPs no marcados en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ .  $5 \times 10^4$  dpm de la sonda de DNA fue usada para cada ensayo de unión: 5  $\mu\text{g}$  de proteína nuclear fueron incubados por 15 min a 4 °C con la sonda y con 1  $\mu\text{g}$  de poli-(dl-dC), 5% glicerol, 1 mmol/l EDTA, 10 mmol/l KCl, 5 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 1 mmol/l DTT y 10 mmol/l Tris-HCl (pH 7.8) en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . Los complejos DNA-proteína fueron separados en geles nativos de poli(acrilamida 6% en 0.5% buffer Tris-borato-EDTA (Goren y col., 2004). Los geles fueron secados y expuestos a películas Kodak a -70 °C.

### **7-7 ENSAYO DE AMP CÍCLICO (cAMP)**

Células provenientes de ratones control y CMS ( $1 \times 10^7$ /ml en 1 ml de PBS) fueron pre-incubadas con isobutil metil xantina (IBMX) (200  $\mu$ M) por 20 min e incubadas en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de nor-adrenalina por 10 min. Al final de la incubación se agregaron 2 ml de etanol pre-enfriado a  $-20^\circ\text{C}$ . Las células fueron homogeneizadas, los sobrenadantes evaporados a  $55^\circ\text{C}$  bajo corriente de nitrógeno y el residuo fue disuelto en 0.5 ml de buffer de ensayo de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La determinación del nucleótido se realizó mediante un enzimoimmuno ensayo utilizando un equipo comercial (Amersham Pharmacia Biotech).

### **8- ENSAYO DE UNIÓN DE FITC-CON A**

Se realizaron análisis de Scatchard para estudiar la unión de FITC-Con A a fracciones celulares enriquecidas en linfocitos T de acuerdo con el método descrito por Gordon (1995). Brevemente, el ensayo se realizó utilizando  $5 \times 10^6$  células en 1 ml de RPMI 1640 conteniendo 2 mg/ml BSA y FITC-Con A en concentraciones crecientes (2-150  $\mu$ g/ml). Luego de 30 min de unión, las células fueron lavadas por centrifugación en medio suplementado con 20 mM  $\text{NaN}_3$ , resuspendidas en 0.5 ml y mantenidas en hielo hasta ser pasadas por un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Inmediatamente antes del análisis, las células fueron dispersadas pasándolas cinco veces por una aguja de 26G. Se analizaron un mínimo de 10.000 células marcadas para cada concentración de FITC-Con A empleada. La unión específica fue calculada como la diferencia entre la unión en ausencia y en presencia de 100 mM  $\alpha$ -metil manosido.

## **9-REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR CORTICOIDES Y CATECOLAMINAS**

### **9-1 DETERMINACIÓN DE CATECOLAMINAS**

Se determinó la concentración de catecolaminas en plasma y en bazo. Para esto, el bazo fue homogeneizado en sulfito de sodio 12.5%, EDTA 10% en ácido perclórico 0.4 N. Después de 24 hs a  $4^\circ\text{C}$  el homogenato fue centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. La concentración de catecolaminas fue determinada por el método de Laverty y Taylor (1968). Los sobrenadantes fueron llevados a pH 8.2 y sembrados en columnas de alumina pre-lavadas. El eluato fue oxidado con iodo en medio

alcalino. La fluorescencia se registró a 375 nm en un espectrofluorómetro usando una fuente de excitación de 325 nm.

## **9-2 DETERMINACIÓN DE AMINAS**

Los animales fueron sacrificados por decapitación, los cerebros fueron extraídos y los hipocampos fueron separados y homogeneizados en ácido perclórico 0.1N. Las concentraciones de serotonina, ácido 5-hidroxiindolacético, adrenalina y nor-adrenalina, dopamina y dihidroxifenilacetato fueron determinadas utilizando un cromatógrafo líquido de alta presión acoplado a un detector electroquímico BAS (HPLC-EC).

## **9-3 DETERMINACIÓN DE CORTICOSTERONA**

Los animales fueron sangrados y la sangre fue recogida en presencia EDTA a 4°C y centrifugada a 300 x g durante 30 min en condiciones refrigeradas. El plasma fue almacenado a -80°C hasta la realización del ensayo. Los niveles de corticosterona fueron determinados por radioinmunoensayo comercial de doble anticuerpo altamente sensible (ICN Biomedical INC) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **9-4 ACCIÓN DE CORTICOIDES Y CATECOLAMINAS SOBRE LA REACTIVIDAD INMUNOLÓGICA**

Para estudiar la acción de corticoides y catecolaminas sobre la respuesta inmune, se realizaron curvas dosis-respuesta de corticosterona y adrenalina y nor-adrenalina respectivamente y se analizó la proliferación linfocitaria inducida mitogénicamente. Se siguió el protocolo descrito en el punto 4-2 utilizando 100 µl de suspensión celular, 50 µl de mitógeno y 50 µl de la hormona a analizar. Tanto para corticosterona como para adrenalina o nor-adrenalina se utilizó un rango de concentraciones de  $10^{-5}$  -  $10^{-9}$  M.

## **10- CAMBIOS EN EL BALANCE TH1/TH2**

A fin de evaluar cambios en el balance TH1/TH2 se determinaron los niveles de IL-2, IL-6 e IFN-γ en sobrenadantes de linfocitos T o macrófagos de animales normales y CMS estimulados

mitogénicamente durante 24 y 48 hs mediante técnicas de ELISA utilizando equipos comerciales (Amersham Biosciences).

### **11- ACCIÓN DE IL-6 SOBRE EL COMPORTAMIENTO**

Con el fin de evaluar la presencia de cambios conductuales y morfológicos inducidos por administración de ILs se inyectaron animales normales con IL-6 (200 ng/ratón) durante 5 días. En estos animales se evaluó el efecto de la administración crónica de esta CQ sobre la conducta como fuera descrito en el punto 3 y se estudió la inducción de cambios morfológicos en hipocampo como se describiera en el punto 4.

### **12- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para determinar el nivel de significación entre dos grupos de datos con distribución normal, se utilizó el Test t de Student para valores no apareados.

Las diferencias entre tres o más grupos de datos fueron evaluadas por análisis de varianza (ANOVA) de un factor o de dos factores según correspondiera, seguido de una comparación múltiple utilizando el test Student–Newman–Keuls.

En aquellos casos en que los datos no siguieron una distribución normal se utilizó el test no paramétrico de Kruskal–Wallis y se realizaron análisis post hoc usando el test de comparación múltiple de Dunn. Los datos fueron expresados como los valores medios  $\pm$  error estándar de la media ( $X \pm SEM$ ). Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

---

## 1-VALIDACIÓN DEL MODELO DE ESTRÉS CRÓNICO MODERADO.

De acuerdo a la clasificación del DSM-IV, el diagnóstico de la depresión mayor requiere la presencia de al menos unos de dos síntomas cardinales: ánimo decaído o pérdida de interés o de experimentar placer (anhedonia). El ánimo decaído no puede ser evaluado en un modelo animal pero el estado anhedónico sí. Por este motivo, lo primero que se evaluó en el modelo de estrés crónico desarrollado en nuestro laboratorio fue la presencia de anhedonia así como también la reversión con un antidepresivo.

### 1-1 ANHEDONIA Y PÉRDIDA DE PESO.

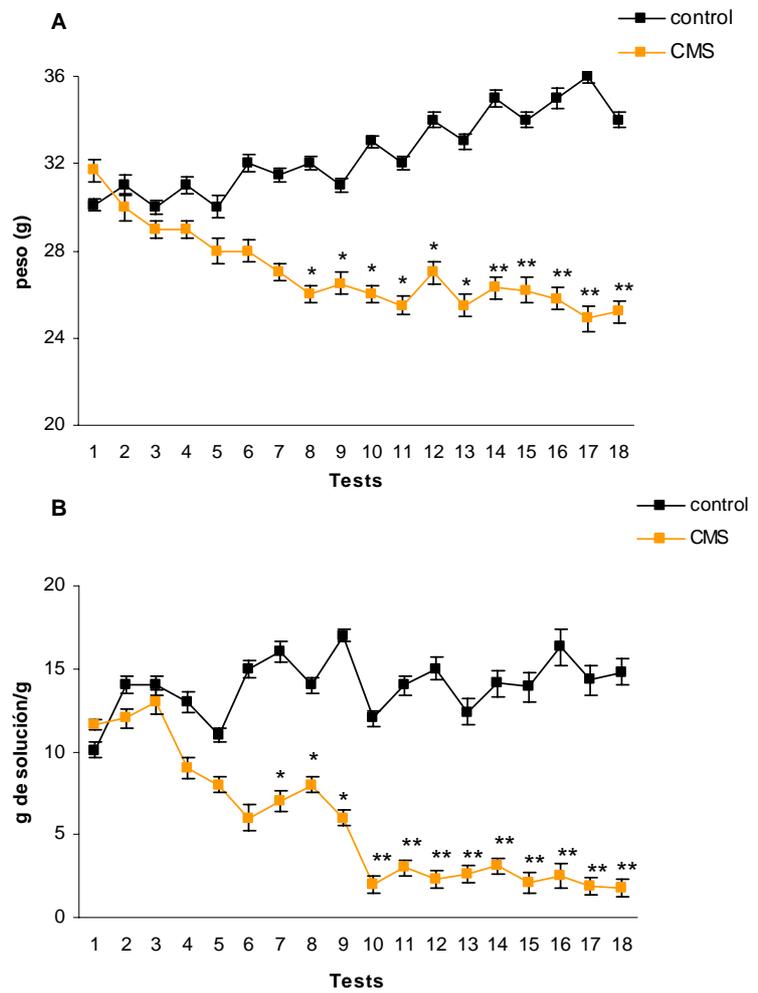
El grado de anhedonia se evaluó mediante el test de consumo de sacarosa. Este test permite evaluar conductas motivadas con valor hedónico. Los roedores muestran una preferencia marcada por el agua azucarada en relación a la no azucarada. En modelos animales de depresión y/o de estrés crónico, el consumo de agua azucarada se ve disminuído por lo que se ha propuesto la disminución del consumo de sacarosa, respecto de una línea base establecida previamente, como indicador del estado motivacional del individuo, estado que se considera un signo de anhedonia (Willner, 1997). La pérdida de peso es otro de los síntomas asociados al estado depresivo, a los fines de evaluar correctamente el consumo de sacarosa se determinó este parámetro en este modelo. Teniendo en cuenta que los animales estresados pueden presentar un menor consumo de la solución simplemente por tener un menor peso, se determinó el consumo de sacarosa por unidad de masa a los fines de independizarse de este parámetro.

Durante la primera fase del estudio (fase de entrenamiento) no se observaron diferencias significativas entre los grupos control y CMS para ninguno de los parámetros estudiados (peso: ( $F[2, 177] = 2,146$ ); consumo de sacarosa:  $F[2,177] = 2,787$ ). El peso medio en el último test de esta fase fue  $30.7 \pm 0.2$  g. El consumo medio de sacarosa fue de  $10.9 \pm 0.31$   $\mu$ l/g. Como puede observarse en la Figura 11, ninguno de estos parámetros varió significativamente en animales control durante el experimento. Por otro lado, en animales CMS, ambos parámetros se vieron alterados después de 2 semanas de sometimiento al esquema de estrés crónico alcanzando su máxima expresión a partir de la cuarta semana. Luego de 6 semanas de exposición a CMS, el peso (Figura 11 A) y el consumo de sacarosa (Figura 11 B) fueron significativamente menores en animales estresados que en los controles.

3 hs. privación de agua y alimento



Test de sucrosa



**FIGURA 11: CONSUMO DE SACAROSA Y CONTROL DE LA MASA CORPORAL**

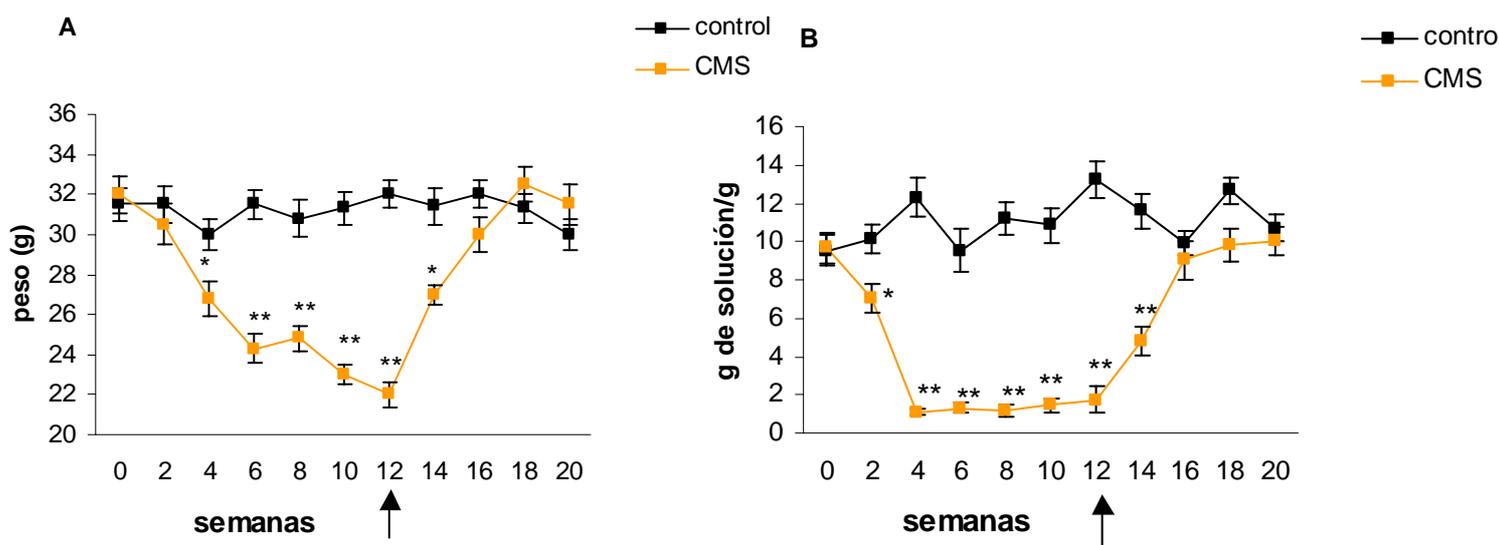
Se determinaron el peso (A) y el consumo de sacarosa (B) en animales control (—) y sometidos a CMS (—). Los datos representan la media ± ES de tres determinaciones realizadas en 30 animales de cada grupo.

\*  $p < 0.01$  respecto del correspondiente valor control.

\*\*  $p < 0.001$  respecto del correspondiente valor control.

## 1-2 REVERSIÓN CON ANTIDEPRESIVOS

Para validar el modelo de depresión, se evaluó la reversión de los parámetros antes mencionados tras la administración oral de tianeptina, antidepresivo atípico que incrementa la captación de serotonina en estructuras cerebrales que participan en la regulación del eje HPA. Tras cuatro semanas de sometimiento al esquema de estrés crónico, los animales recibieron 15 mg/kg/día de la droga seis veces por semana durante 4 semanas. Es importante aclarar que el esquema de estrés no fue interrumpido durante el tratamiento con el antidepresivo. Se analizaron la variación del peso (Figura 12 A) y el consumo de sacarosa (Figura 12 B) tal como fuera descrito en el punto 1-1. Tanto el consumo de la solución azucarada como el peso recuperaron los valores basales después de 2 semanas de tratamiento.



**FIGURA 12: REVERSIÓN CON ANTIDEPRESIVOS**

Se determinaron el peso (A) y el consumo de sacarosa (B) en animales control (—) y sometidos a CMS (—) tras la administración de tianeptina. Los datos representan la media ± ES de tres determinaciones realizadas en 30 animales de cada grupo. La flecha indica el inicio del tratamiento con el psicofármaco.

\*  $p < 0.01$  respecto del correspondiente valor control.

\*\*  $p < 0.001$  respecto del correspondiente valor control.

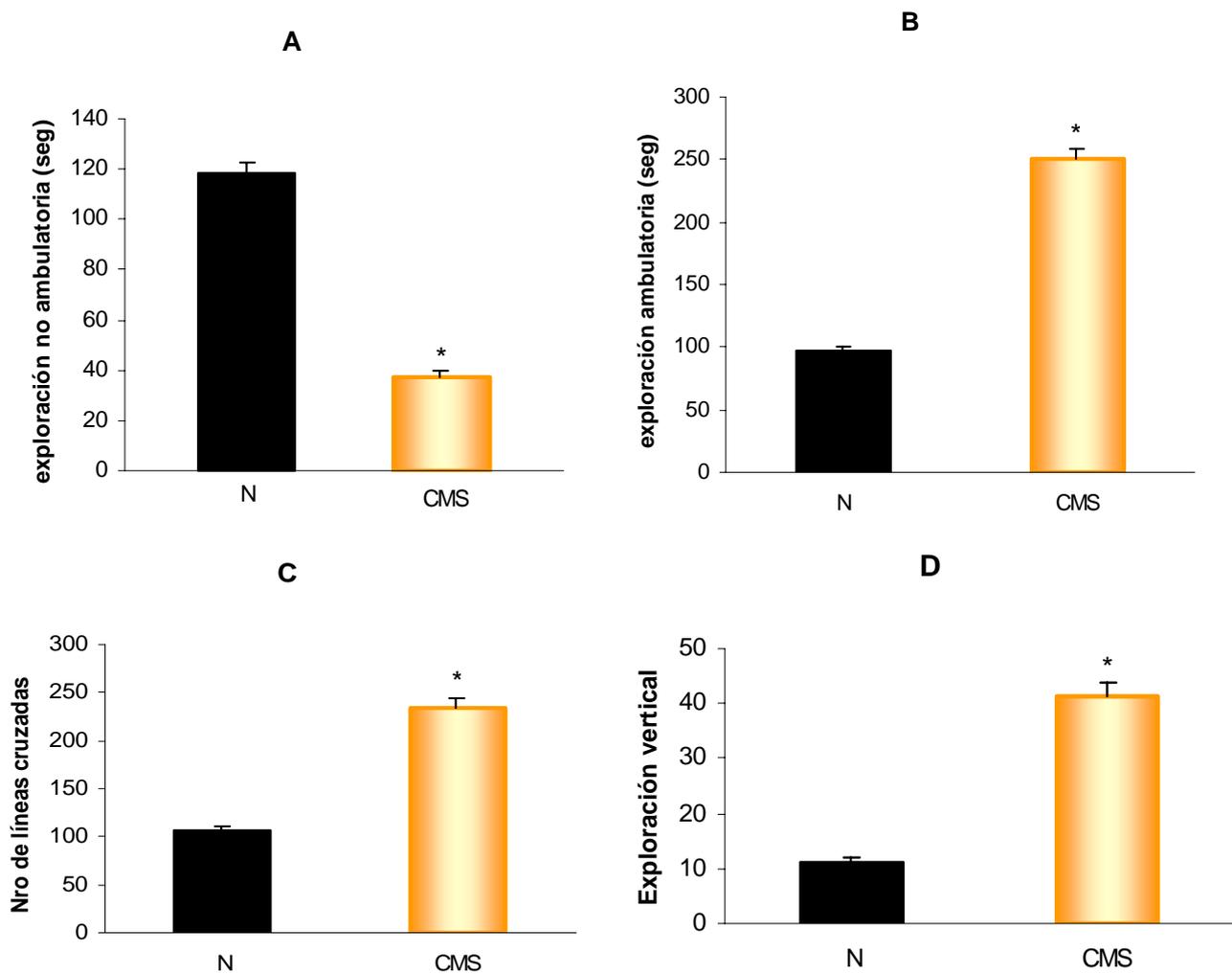
## **2- OTROS PARÁMETROS CONDUCTUALES ALTERADOS POR SOMETIMIENTO A ESTRÉS CRÓNICO**

*A menos que se indique, en los siguientes experimentos, se hace referencia a los animales CMS como a los animales expuestos al esquema de estrés crónico durante 6 semanas.*

### **2-1 ACTIVIDAD EXPLORATORIA EN UN AMBIENTE NOVEDOSO**

La observación de la actividad exploratoria en un ambiente novedoso, que resulta del balance entre factores como ser la curiosidad o el miedo, permite evaluar el estado general del animal así como también su nivel de alerta y distintas variables vinculadas con su estado emocional (en este caso se considera una variable emocional el grado de ansiedad que es capaz de provocar un ambiente novedoso).

Como puede observarse en la Figura 13, la exposición a CMS alteró significativamente los patrones de comportamiento evaluados por el Test de Campo abierto. El tiempo dedicado a la exploración ambulatoria fue mayor en animales CMS respecto de los controles (Figura 13 B). Contrariamente, el tiempo de exploración no ambulatoria fue menor en estos animales respecto de los animales control (Figura 13 A). La actividad locomotora, analizada según el número de líneas cruzadas, fue 2.5 veces mayor en animales CMS (Figura 13 C) así como también el número de exploraciones verticales (Fig. 2D).



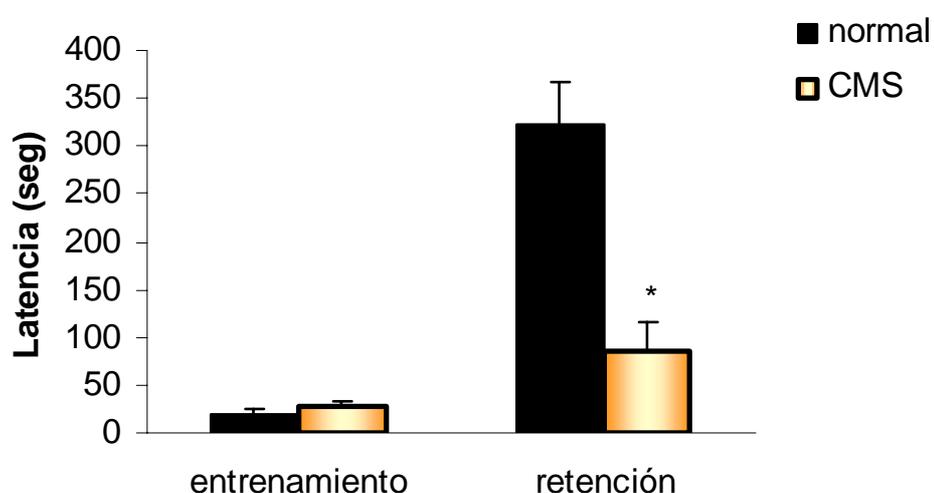
**FIGURA 13: EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A CMS EN EL TEST DE CAMPO ABIERTO.**

Ratones control (■) expuestos a CMS durante 6 semanas (■) fueron sometidos al test de campo abierto durante 10 min y se determinó la exploración no-ambulatoria (A), la exploración ambulatoria (B), actividad locomotora (C), y exploraciones verticales (D). Los resultados muestran la media ± ES de determinaciones realizadas en 30 animales de cada grupo.

\*  $p < 0.001$  respecto del correspondiente valor control.

### 2-3 TEST DE EVITACIÓN INHIBITORIA

La conducta instintiva de los roedores, animales con hábitos nocturnos, hace que prefieran los ambientes oscuros o poco iluminados. Por lo tanto, si el animal es colocado en el compartimento iluminado tenderá a pasar a la zona oscura. Si el animal recibe un estímulo aversivo al pasar al ambiente oscuro se producirá una modificación en la conducta exploratoria y si el animal es expuesto nuevamente a la situación, se espera que permanezca más tiempo en el área iluminada para evitar el estímulo aversivo asociado con el área oscura. El tipo de memoria evaluada con este test es asociativa. En la fase de entrenamiento, no se observaron diferencias significativas en el tiempo de latencia entre los animales CMS y los animales control. Un día después de haber recibido la descarga eléctrica, los animales CMS mostraron una latencia de escape hacia el compartimento oscuro menor que los animales control indicando una alteración en la capacidad de aprendizaje y memoria (Figura 14).



**FIGURA 14 : EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A CMS EN LA CONDUCTA DE EVITACIÓN PASIVA.**

Se determinaron las latencias de entrenamiento y de retención en animales control (■) y sometidos a CMS (■). Los resultados mostrados representan la media  $\pm$  ES de determinaciones realizadas en 10 animales de cada grupo.

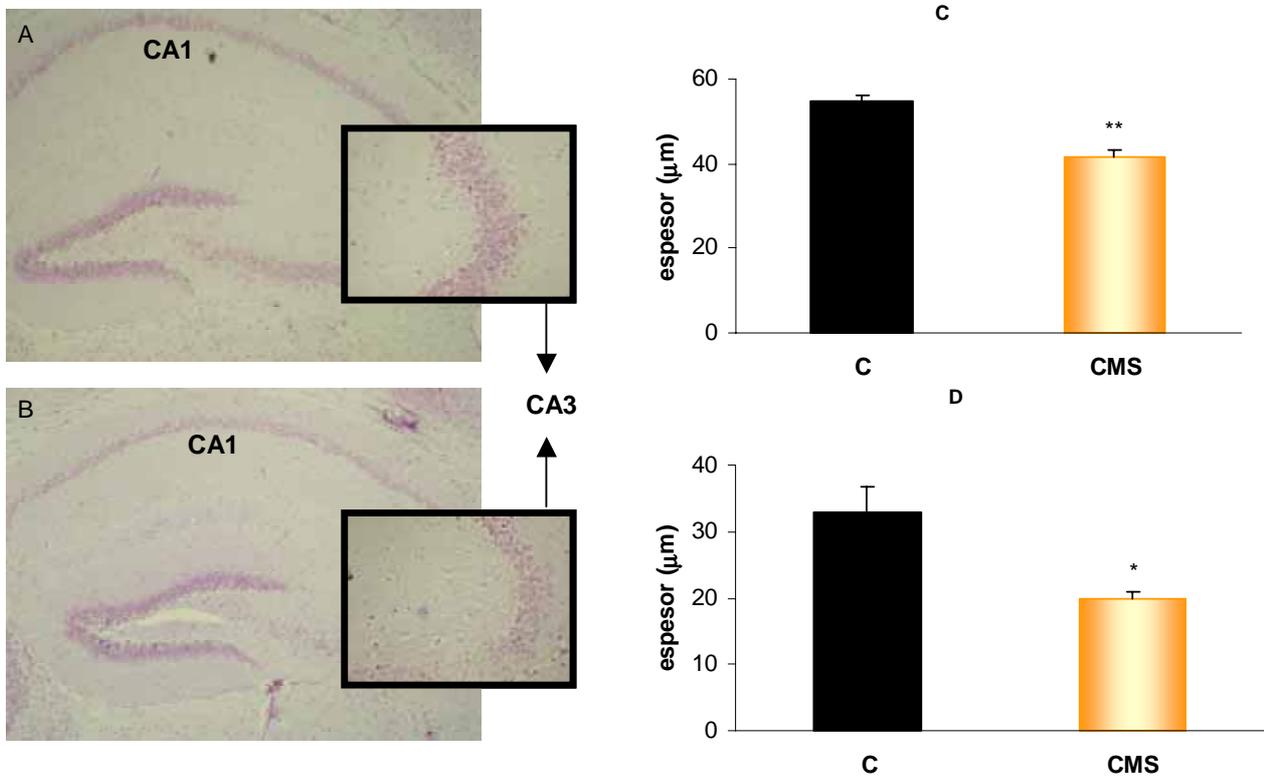
\* Difiere significativamente del correspondiente valor normal con  $p < 0.01$ .

### **3-ANÁLISIS DE CAMBIOS ESTRUCTURALES Y MONOAMINAS IMPLICADAS EN DEPRESIÓN**

En algunas alteraciones psiquiátricas es esperable que existan cambios funcionales acompañados de cambios anatómicos resultantes por ejemplo de procesos inflamatorios o degenerativos. Así, es importante evaluar si hay pérdida neuronal o cambios en los niveles de las monoaminas que han sido implicadas en la depresión.

#### **3-1 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DEL HIPOCAMPO**

Para determinar si el modelo de estrés crónico utilizado tenía algún efecto sobre la estructura del hipocampo, se analizaron cortes coronales de esta región proveniente de animales control (Figura 15 A) y CMS (B). Pudo observarse que el espesor de las zonas CA1 (D) y CA3 (C) es menor en hipocampos de animales CMS respecto de animales control. Esta reducción es especialmente evidente en la zona CA3 (ver recuadro).



**FIGURA 15: HISTOLOGÍA DE LA ZONA CA3 DE HIPOCAMPO NORMAL Y ESTRESADO.**

En hipocampos de animales control (A) y CMS (B) se evaluó el espesor de la zona CA3 (C) y CA1 (D). Los cortes se observaron y fotografiaron en un microscopio Axiphot Carl Zeiss usándose una máquina fotográfica digital Nikon de 4,5 megapíxeles. Las áreas histológicas fueron elegidas al azar y muestran un experimento representativo de 5 realizados con un animal de cada grupo.

\*  $p < 0.05$  respecto del valor control.

\*\*  $p < 0.001$  respecto del valor control.

### 3-2 NIVELES DE CATECOLAMINAS Y SEROTONINA EN HIPOCAMPO

Se determinaron los niveles de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), su metabolito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), adrenalina, nor-adrenalina, dopamina (DA), su metabolito dihidroxifenilacetato (DOPAC). Como se observa en la Tabla 1, los niveles de serotonina en los hipocampos de animales CMS fueron significativamente mayores que en los de animales control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ni el nivel de su metabolito ni en la actividad serotoninérgica estimada según la relación 5-HIAA/5-HT. Asimismo, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los niveles de las otras aminas estudiadas.

Tabla 1

Determinación de aminas en hipocampo de animales controles y CMS por HPLC

|                       | Concentración (pmol/mg) |             |
|-----------------------|-------------------------|-------------|
|                       | Control                 | CMS         |
| <b>5-HT</b>           | 2.26±0.013              | 3.14±0.33*  |
| <b>5-HIAA</b>         | 1.52±0.09               | 1.92±0.21   |
| <b>5-HIAA/ 5-HT</b>   | 0.68±0.04               | 0.61±0.04   |
| <b>Adrenalina</b>     | 0.043±0.006             | 0.033±0.005 |
| <b>Nor-adrenalina</b> | 2.33±0.36               | 2.71±0.39   |
| <b>DA</b>             | ND                      | ND          |
| <b>DOPAC</b>          | ND                      | ND          |

\*p<0.01 respecto del valor control.

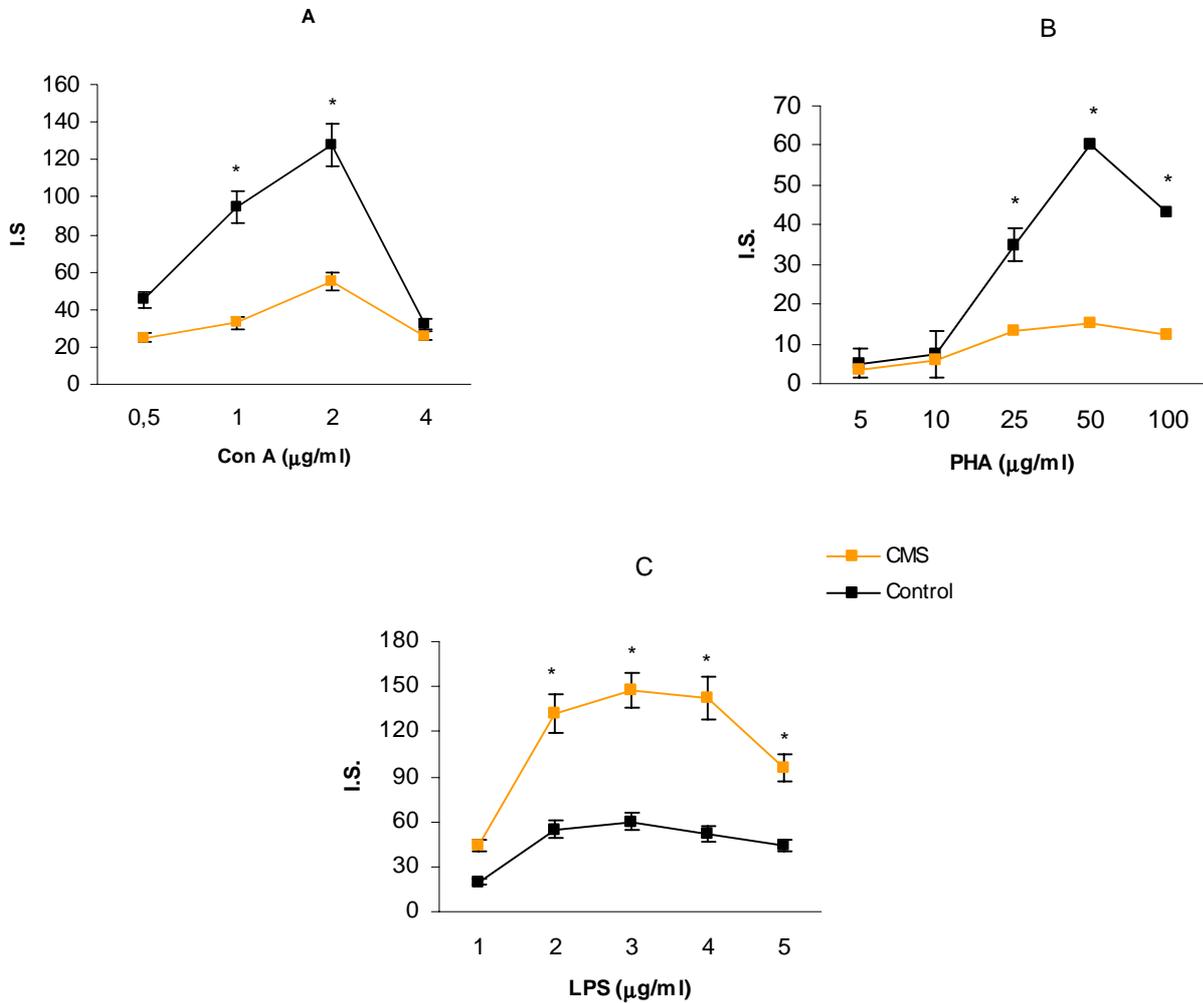
#### **4- ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA RESPUESTA INMUNE**

El análisis de proliferación es una prueba de la reactividad linfocitaria que examina con qué eficacia se dividen las células estimuladas mitogénicamente. Se asume que una mayor proliferación indica una función celular más efectiva. Para evaluar la funcionalidad de LT se utilizaron como mitógenos selectivos concanavalina A (ConA) y fitohemaglutinina (PHA). Para LB se utilizó lipopolisacárido (LPS).

##### **4-1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE MITÓGENOS**

Se realizaron curvas concentración-respuesta para determinar la concentración óptima de mitógeno a utilizar en ensayos posteriores. Linfocitos T y B provenientes de animales control y CMS fueron incubados con concentraciones crecientes de: Con A y PHA para LT (Figuras 16 A y 16 B) y LPS para LB (Figura 16 C). La proliferación máxima fue alcanzada para las siguientes concentraciones: 2  $\mu\text{g/ml}$  de Con A, 50  $\mu\text{g/ml}$  de PHA y 30-75  $\mu\text{g/ml}$  de LPS.

Se encontraron concentraciones óptimas similares para LT y LB de animales CMS. Los LT provenientes de animales CMS mostraron una menor respuesta a ConA (Figura 16 A) y a PHA (Figura 16 B) mientras que la respuesta de LB fue mayor cuando se estimularon con LPS (Figura 16 C) respecto de los animales control. Es importante notar que se encontraron resultados similares cuando células esplénicas fueron estimuladas con ConA o PHA o células provenientes de ganglios fueron estimuladas con LPS (datos no mostrados).



**FIGURA 16: CURVA CONCENTRACIÓN–RESPUESTA DE LINFOCITOS ESTIMULADOS MITOGÉNICAMENTE**

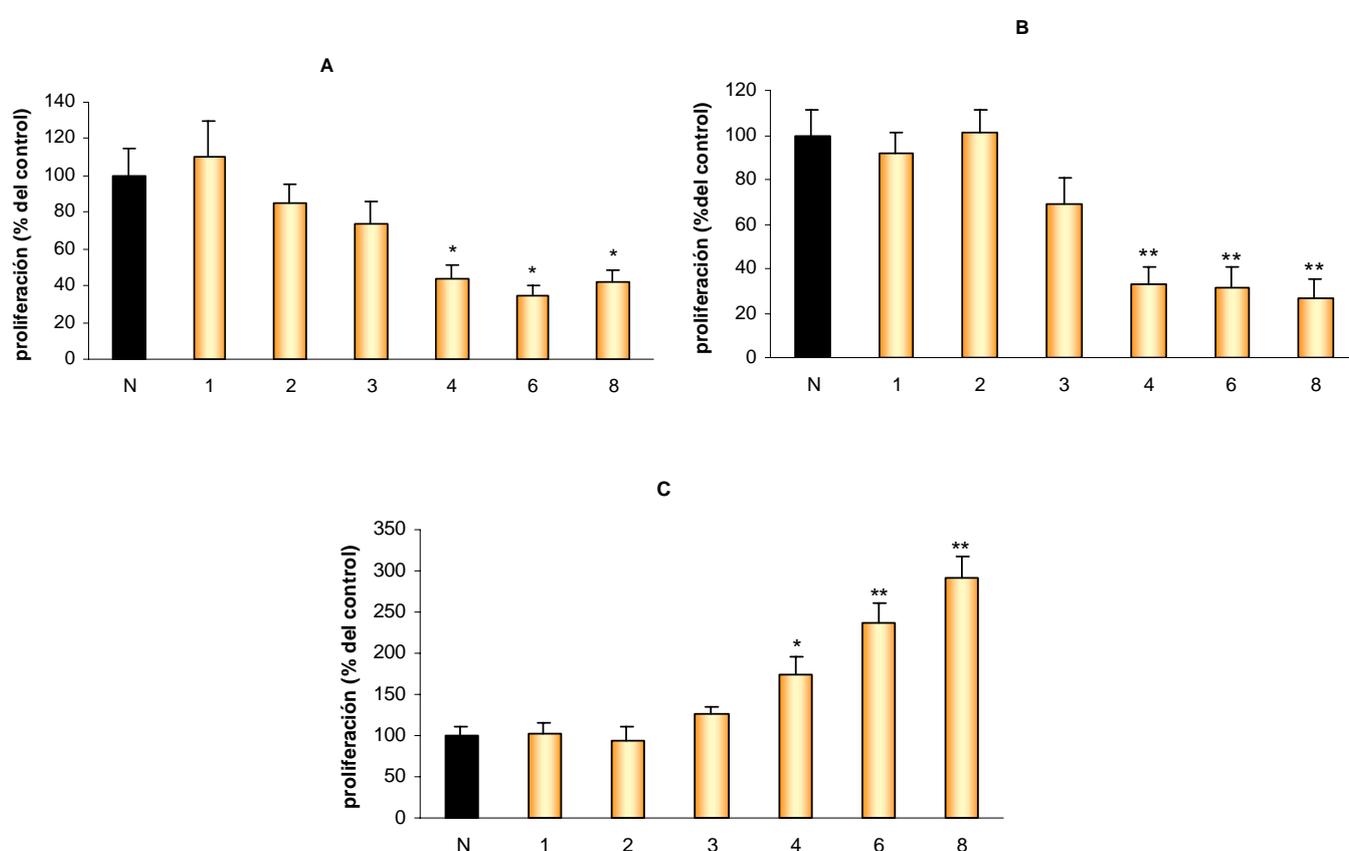
Células provenientes de animales control (■) y expuestos a CMS (■) fueron estimuladas con distintas concentraciones de Con A (A), PHA (B) y LPS (C) y se determinó la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina.

Los resultados representan la media ± ES de tres experimentos realizados por triplicado.

\*p<0.01 respecto del valor control.

## 4-2 RELACION TEMPORAL ENTRE LA EXPOSICIÓN A CMS Y LA APARICION DE ALTERACIONES EN LA RESPUESTA PROLIFERATIVA

Linfocitos T y B provenientes de animales control y sometidos durante 1 a 8 semanas al esquema de estrés crónico fueron estimulados con las concentraciones óptimas de Con A, PHA o LPS determinadas en el punto 3-1. Los LT de animales CMS presentaron una disminución en la respuesta proliferativa a partir de la 4<sup>ta</sup> semana de exposición (Figuras 17 A y 17 B) y los LB mostraron una respuesta aumentada comparada con la de los linfocitos normales (Figura 17 C).



**FIGURA 17: RESPUESTA PROLIFERATIVA INDUCIDA POR MITÓGENOS**

Linfocitos T y B provenientes de animales control (■) y sometidos al esquema de estrés crónico durante 1 a 8 semanas (■) fueron estimulados con Con A (A), PHA (B) y LPS (C). Los resultados se expresan como porcentaje de la respuesta proliferativa respecto de células de animales no expuestos a CMS y representan la media ± ES de 5 experimentos realizados por triplicado.

\* Diferencia significativa respecto de animales no expuestos con  $p < 0.05$

\*\* Diferencia significativa respecto de animales no expuestos con  $p < 0.01$

## 5- ANÁLISIS *IN VIVO* DE LA RESPUESTA INMUNE

### 5-1 ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA POR CMS

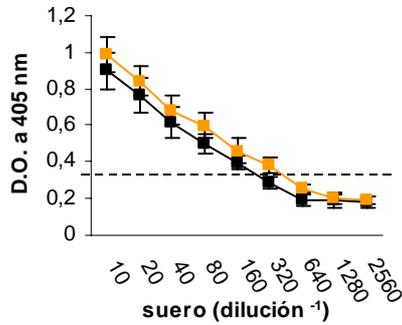
Para estudiar el correlato *in vivo* de los resultados obtenidos *in vitro*, se analizó la respuesta inmune humoral inducida por inoculación con Ags T-dependientes (GRC) y T-independientes (LPS).

Como fuera mencionado previamente, para Ags T-dependientes, se produce primero IgM y luego IgG, siendo la contribución global de la IgM más importante. Tras una segunda inoculación (respuesta secundaria) el Ac predominante es de tipo IgG. Para la producción de Acs tipo IgG por parte de los LB es necesaria la colaboración de los LT. Para Ags T-independientes, tanto si la respuesta es primaria o secundaria, el Ac producido es de tipo IgM y no es necesaria la colaboración de LT. Por este motivo, tras la inoculación con GRC se determinó la producción de Ac tipo IgG e IgM mientras que para analizar la respuesta a LPS sólo se determinó la producción de Ac tipo IgM siguiendo el esquema experimental detallado en el punto 4-3 de Materiales y Métodos.

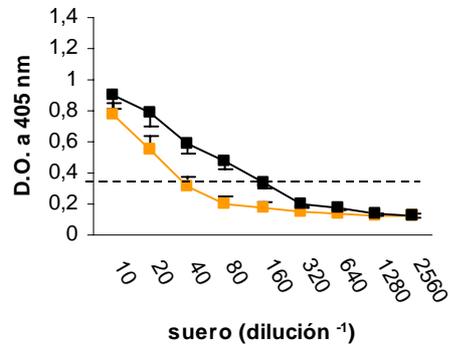
El desafío antigénico con GRC indujo una producción de anticuerpos tipo IgM, que tampoco mostró diferencias entre ambos grupos (Figura 18 A y C). Contrariamente, la producción de anticuerpos tipo IgG se vio seriamente afectada en los animales CMS ( $p < 0.01$ ). Estos resultados se corroboraron tras una segunda inmunización antigénica (Figura 18 B y D). Como puede observarse en la Figura 18 E, el título de IgM anti-LPS fue similar entre ratones normales y CMS.

Es importante aclarar que la disminución en la producción de anticuerpos tipo IgG no se debió a un retardo en la cinética de la producción ya que no se observó un aumento del título, al menos hasta dos semanas post-inoculación (datos no mostrados).

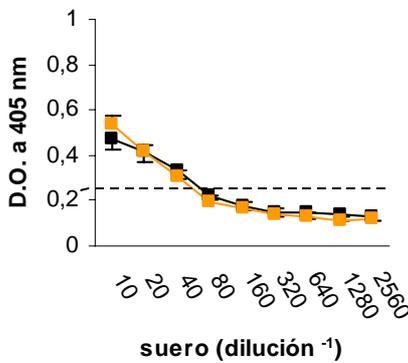
A- IgM anti-GRC 10 días



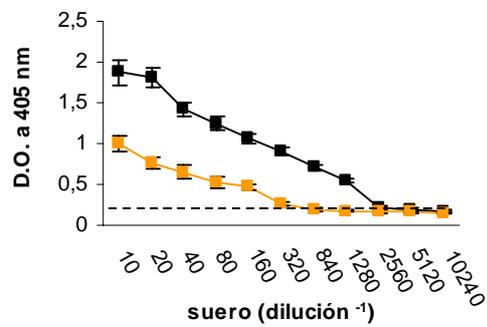
B- IgG anti-GRC 10 días



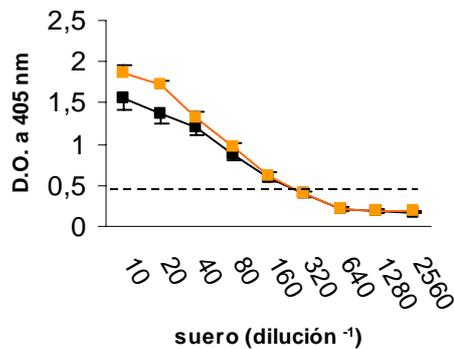
C- IgM anti-GRC 18 días



D- IgG anti-GRC 18 días



E- IgM anti-LPS 10 días



**FIGURA 18: PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS EN RESPUESTA A LA INOCULACIÓN CON ANTÍGENOS T-DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES**

Se determinaron los títulos de Acs en ratones control (■) y CMS (□) inmunizados con GRC (A y B), y luego de un refuerzo dado al día 11 con GRC (C y D) o inmunizados con LPS (E). Los sueros fueron recolectados en el día 10 (A, B y E) o en el día 18 (C y D) y se ensayó la presencia de IgM (A, C y E) o IgG (B y D). Las curvas mostradas son representativas de 8 experimentos realizados por duplicado. Cada experimento fue realizado con uno o dos sueros de cada condición experimental. La línea punteada representa los valores de densidad óptica (D.O.) + 2 veces el desvío estándar respecto del suero de animales normales.

## 6- DISTRIBUCIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

Para determinar si la alteración de la respuesta inmune tanto *in vitro* como *in vivo* era debida a cambios en la distribución de los subtipos celulares se analizaron los porcentajes de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4CD8<sup>+</sup> y CD4CD8<sup>-</sup> por citometría de flujo en bazo, ganglios y sangre periférica de animales control y CMS. Los estudios demostraron que la alteración de la respuesta inmune observada no es debida a una alteración de la distribución de las subpoblaciones linfocitarias (Tabla 2).

Tabla 2

Porcentaje de subpoblaciones linfocitarias en animales control y CMS

|                                  | Tejido              | Subpoblaciones linfocitarias<br>(% de linfocitos totales) |        |               |               |
|----------------------------------|---------------------|---|--------|---------------|---------------|
|                                  |                     | CD4(+)  | CD8(+) | CD4(+)/CD8(+) | CD4(-)/CD8(-) |
| No expuestos                     | Ganglios linfáticos | 60±6  | 11±3   | 0.47±0.05     | 29±2          |
|                                  | Bazo                | 34±3  | 7±2    | 0.41±0.07     | 59±5          |
|                                  | Sangre periférica   | 53±4  | 15±4   | 0.34±0.06     | 32±3          |
| 5 semanas de<br>exposición a CMS | Ganglios linfáticos | 66±5  | 9±3    | 0.49±0.05     | 25±2          |
|                                  | Bazo                | 41±4  | 6±2    | 0.54±0.08     | 53±7          |
|                                  | Sangre periférica   | 63±6  | 11±3   | 0.96±0.1      | 26±3          |

Análisis por citometría de flujo realizado en suspensiones celulares obtenidas de ganglio linfáticos, bazo y sangre periférica de animales control y expuestos por 6 semanas al esquema de estrés crónico.

Los resultados están expresados como el porcentaje de los linfocitos totales y representan la media ± ES de cuatro experimentos realizados por separado. Cada experimento fue realizado usando un animal de cada grupo experimental.

## 7-SEÑALES INTRACELULARES

Para que los linfocitos se activen se requiere, además del reconocimiento del antígeno por los receptores, la participación de moléculas accesorias y la acción de distintas ILs.

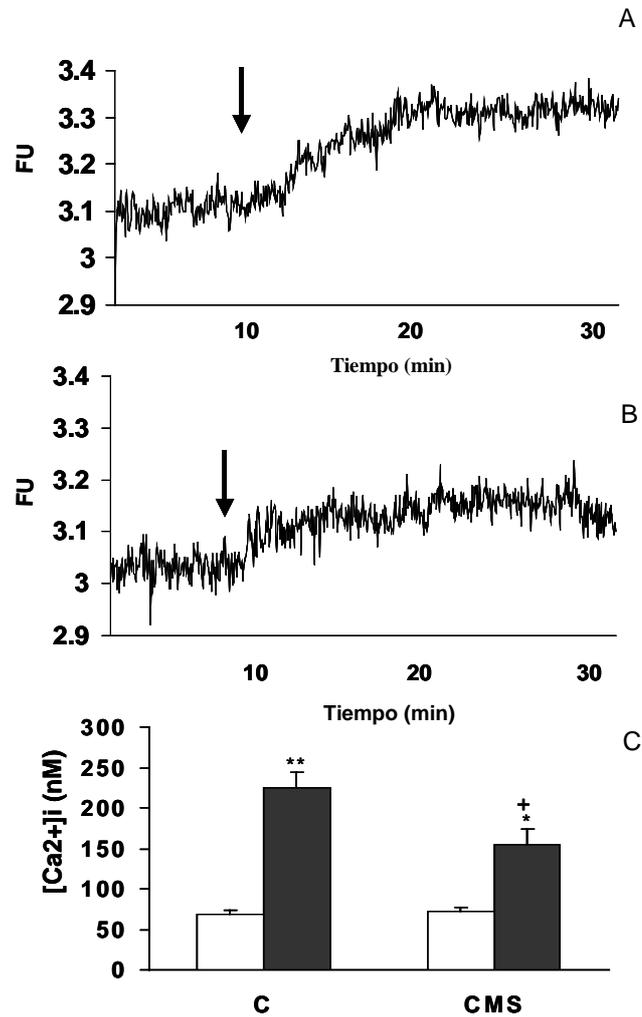
Cuando tiene lugar el reconocimiento antigénico se desencadena una cascada de reacciones bioquímicas en el citoplasma, dando así lugar a procesos de activación, proliferación y diferenciación celular. Estos mecanismos implican la participación de una serie de sustancias intracitoplasmáticas, conocidas como segundos mensajeros y pueden ser de carácter lipídico o proteico que adquieren su carácter funcional al fosforilarse esencialmente en los aminoácidos serina y treonina. Como consecuencia de estos eventos se producirá finalmente la activación de la transcripción de los genes implicados en la síntesis de la proteína involucrada en una determinada función.

### 7-1 SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN LINFOCITOS T

Entre las señales intracelulares tempranas clásicamente involucradas en la activación de linfocitos T se encuentran como señales regulatorias positivas el incremento de  $Ca^{2+}$ , la activación de PKC y la vía del factor NF- $\kappa$ B. Por otro lado, la vía inhibitoria AMP cíclico/proteína quinasa A (cAMP/PKA) es la señal temprana mejor caracterizada implicada en la red de activación/inhibición de procesos que siguen la activación linfocitaria.

#### 7-1-a DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE $Ca^{2+}$

Para determinar si los niveles de  $[Ca^{2+}]$  están alterados por exposición a CMS se realizó un análisis de los cambios a tiempos cortos en la concentración del ión en LT tras la estimulación mitogénica. Como se observa en la Figura 19 A, cuando las células cargadas con el fluorocromo Fura 2-AM fueron incubadas con Con A, se observó un aumento progresivo de los niveles de  $[Ca^{2+}]$  que requirió de 10 a 15 min para alcanzar un nivel máximo sostenido. Los LT de animales CMS mostraron un aumento temporal similar de  $[Ca^{2+}]$  pero la intensidad de la respuesta fue significativamente menor que la observada en linfocitos de animales control (Figura 19 B).



**FIGURA 19: DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE Ca<sup>2+</sup> INTRACELULAR**

Los resultados indican la emisión de fluorescencia a 340 nm tras excitación a 510 nm. Luego de registrar la fluorescencia basal, las células de animales control (A) y CMS (B) fueron estimuladas con Con A (flecha). Se determinó la concentración del Ca<sup>2+</sup> (C) según la fórmula de Cobbold y Rink (1987). Los resultados representan la media ± ES de 6 experimentos individuales.

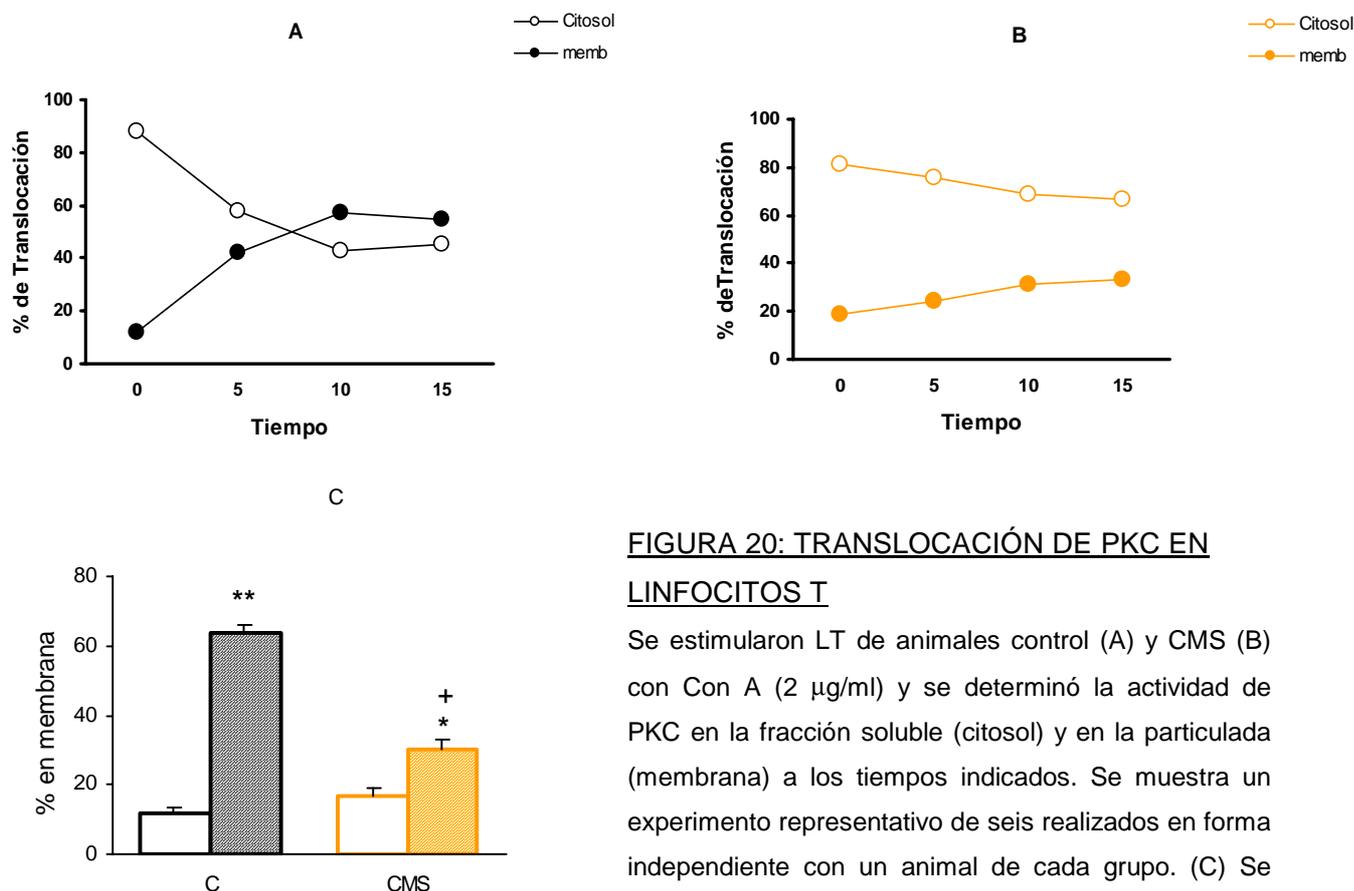
+ p < 0.05 respecto del correspondiente incremento en presencia de Con A del control.

\* p < 0.05 respecto del correspondiente basal.

\*\* p < 0.01 respecto del correspondiente basal.

### 7-1-b ACTIVACIÓN DE PKC TRAS LA ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS T CON Con A

Para analizar el efecto del estrés crónico sobre la activación de PKC inducida por mitógenos, se incubaron LT con Con A por diferentes períodos de tiempo y se determinó la actividad enzimática de PKC en la fracción citosólica y de membrana. Como se muestra en la Figura 20 A, cuando los LT fueron estimulados, se observó un cambio en la distribución subcelular de la enzima dependiente del tiempo. La actividad de PKC disminuyó en la fracción citosólica y fue recuperada en la fracción particulada tanto en células de animales control como en CMS. Sin embargo, en estas últimas la translocación de la actividad hacia la membrana fue significativamente menor que la observada en células control (Figura 20 B). Es importante notar que no se observaron cambios significativos en la distribución basal de PKC en células no estimuladas a los tiempos estudiados (no mostrado).



**FIGURA 20: TRANSLOCACIÓN DE PKC EN LINFOCITOS T**

Se estimularon LT de animales control (A) y CMS (B) con Con A (2 µg/ml) y se determinó la actividad de PKC en la fracción soluble (citosol) y en la particulada (membrana) a los tiempos indicados. Se muestra un experimento representativo de seis realizados en forma independiente con un animal de cada grupo. (C) Se muestra la actividad media ± ES de PKC en la fracción

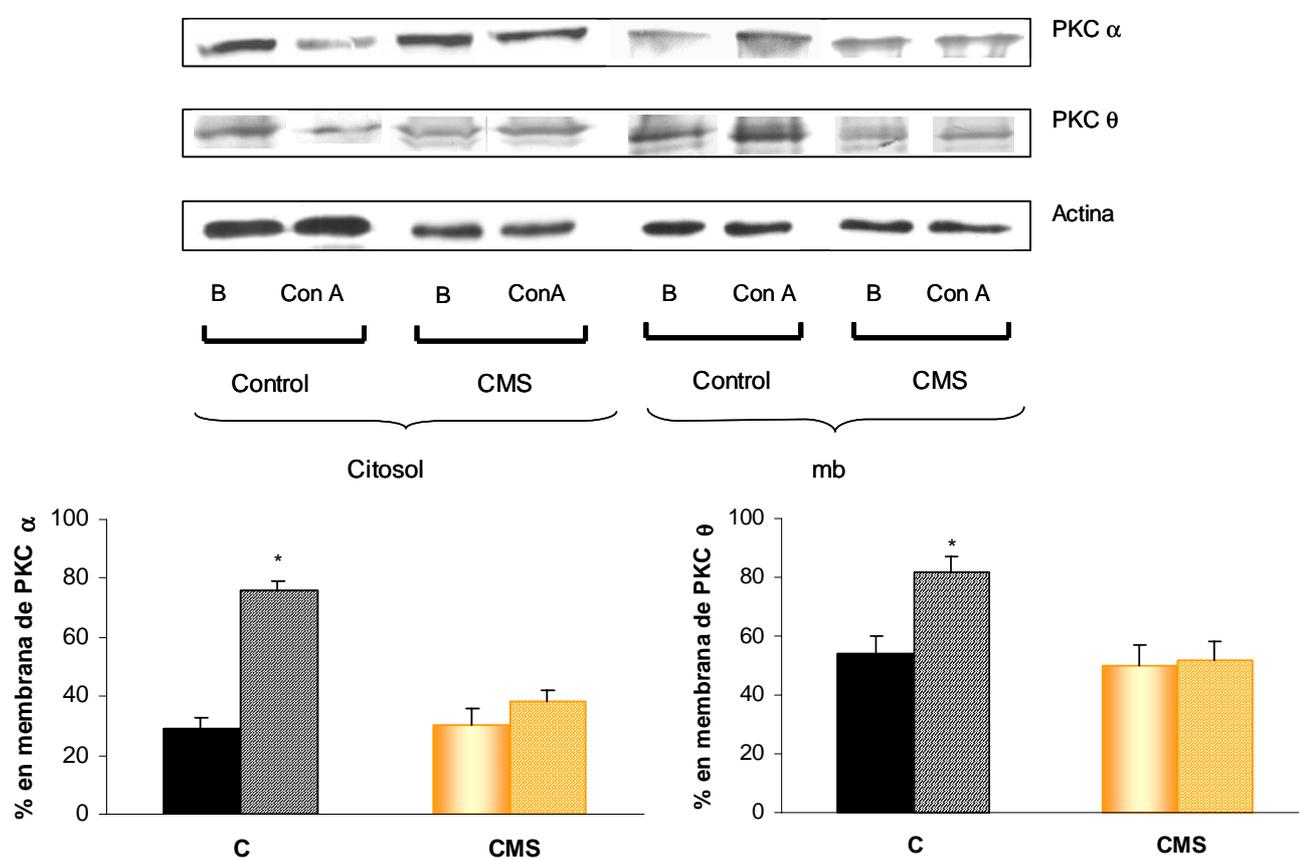
particulada en condiciones basales (barras abiertas) y estimulada por 15 min con Con A (barras rayadas) expresada como el porcentaje de la actividad total de PKC (citosol + membrana).

\* p < 0.05, \*\* p < 0.001 respecto de valores basales.

+ p < 0.05 respecto de valores control.

### 7-1-c EXPRESIÓN DE PKC EN LINFOCITOS T

Como la PKC  $\theta$  y la PKC  $\alpha$  son las principales isoformas de la familia de la enzima involucradas en la activación de LT, se analizó la translocación de estas isoenzimas tras la estimulación mitogénica. Para ello se determinó su distribución en las fracciones solubles y particuladas por Western blot. En la Figura 21 se observa un incremento del nivel de PKC  $\theta$  y PKC  $\alpha$  en la membrana y la concomitante disminución en citosol tras estimulación mitogénica. En las células T de animales CMS este incremento en la membrana fue menor observándose de un porcentaje mayor de esta enzima en la fracción citosólica luego de la exposición al mitógeno.



**FIGURA 21: EXPRESIÓN DE PKC EN LINFOCITOS T**

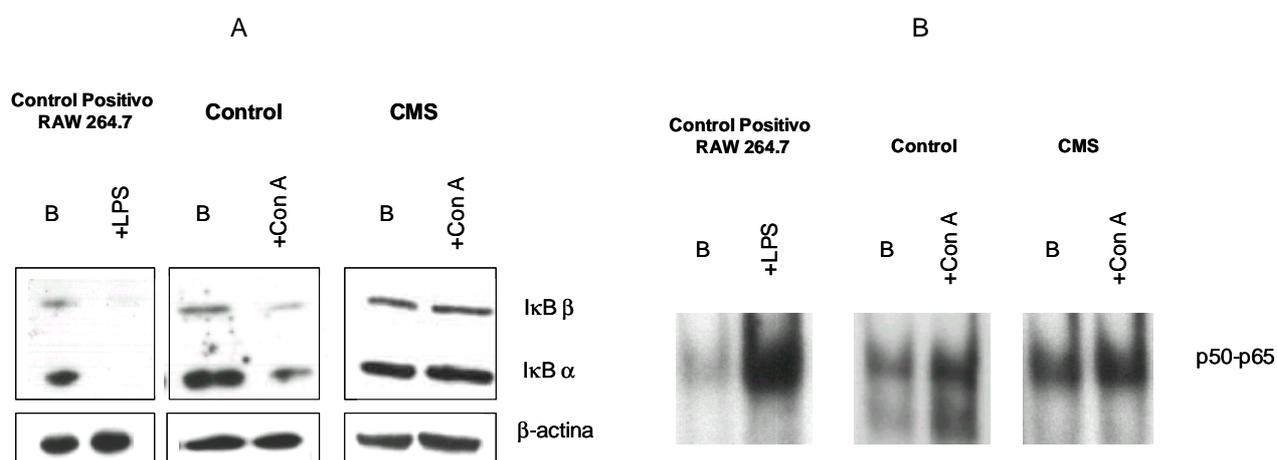
Western blot de PKC utilizando anticuerpos específicos contra las isoformas  $\alpha$  y  $\theta$  de un experimento representativo realizado con las fracciones soluble y particulada obtenidas de linfocitos control y CMS sin estimular (barras llenas) o estimulados con mitógenos (barras rayadas). Se utilizó como control interno de carga un Ac anti- $\beta$ -actina.

Los histogramas representan el porcentaje en la fracción particulada de cada isoenzima determinado por análisis densitométrico de la correspondiente membrana de nitrocelulosa.

\*  $p < 0.01$  respecto del correspondiente valor basal.

### 7-1-d ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE LA VIA NF- $\kappa$ B

Con el fin de investigar si la alteración de la actividad de PKC  $\theta$  inducida por estrés provocaba alguna alteración de la activación del factor nuclear  $\kappa$  B se determinó la presencia de su inhibidor (I $\kappa$ B) en extractos citosólicos por Western blot (Figura 22 A) y de NF-  $\kappa$ B en extractos nucleares por ensayos de movilidad electroforética (EMSA) (Figura 22 B) tras estimulación durante 30 minutos con Con A. Como era de esperar, la activación de LT con Con A indujo una disminución de I $\kappa$ B en citosol y promovió la translocación hacia el núcleo principalmente del heterodímero p65 (RelA)/p50. Células T de animales CMS mostraron una menor activación de NF-  $\kappa$ B luego de la estimulación mitogénica.

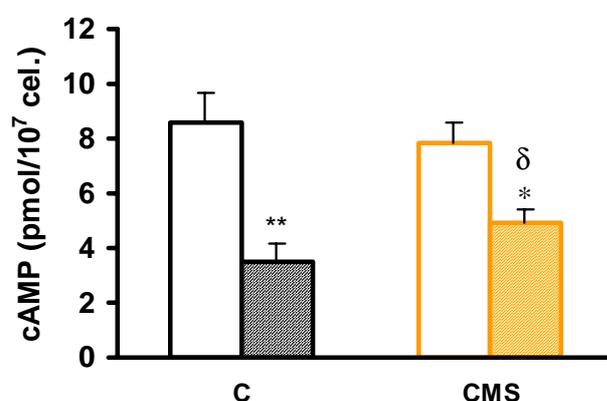


**FIGURA 22: EXPRESIÓN DE I $\kappa$ B  $\alpha$  e I $\kappa$ B  $\beta$  EN CITOSOL Y DE NF-  $\kappa$ B EN NÚCLEO**

Células T de animales control y CMS fueron estimuladas con Con A por 30 min. Se determinaron los niveles proteicos de I $\kappa$ B-  $\alpha$  e I $\kappa$ B-  $\beta$  en extractos citosólicos (A). Se utilizó  $\beta$ -actina como control interno de carga. La actividad de NF-  $\kappa$ B fue determinada en fracciones nucleares (B). Extractos citosólicos y nucleares provenientes de la línea celular RAW 264.7 de macrófagos en condiciones basales y estimulados con LPS fueron usados como controles positivos. Se muestran los resultados obtenidos en un experimento representativo de cuatro realizados en forma independiente con un animal de cada grupo.

### 7-1-e CONCENTRACIÓN DE cAMP

Para evaluar el efecto de la exposición a estrés crónico sobre la vía cAMP/PKA, se analizaron los cambios en los niveles intracelulares de cAMP en linfocitos T normales (C) y CMS no estimulados y estimulados durante 30 minutos con Con A. Como se observa en la Figura 23, la estimulación mitogénica disminuyó significativamente los niveles de cAMP en LT control. El porcentaje de cambio fue significativamente menor en LT de animales CMS.



**FIGURA 23: CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE cAMP EN LT**

Células de animales control (C) y CMS fueron incubadas solas (barras vacías) o en presencia de Con A por 30 min (barras rayadas) y se determinaron los niveles de cAMP.

Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de 6 experimentos realizados por duplicado.

\*\*  $p < 0.001$  respecto del correspondiente valor basal.

\*  $p < 0.01$  respecto del correspondiente valor basal.

δ  $p < 0.05$  respecto del porcentaje de disminución observado en el control.

**7-1-f DISTRIBUCIÓN DE SUBPOBLACIONES EN LA FRACCIÓN ENRIQUECIDA DE CÉLULAS T**

Para asegurar que los cambios en la señalización intracelular observados en células T de animales CMS no eran el producto de diferencias en las subpoblaciones linfocitarias debidas al proceso de purificación, se determinaron los porcentajes de células CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en estas fracciones. Como se observa en la Tabla 3 no se encontraron diferencias significativas entre las fracciones analizadas.

TABLA 3

Porcentaje de poblaciones de linfocitos T en suspensiones de animales control y CMS

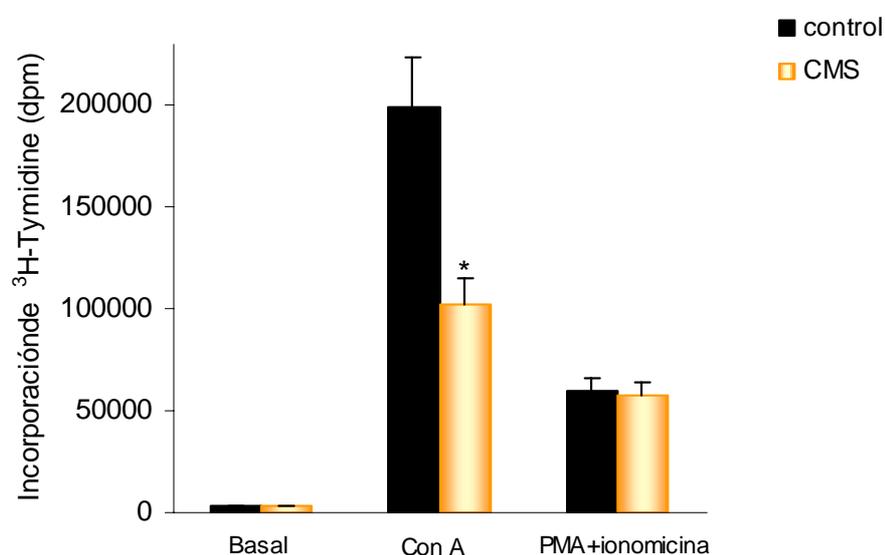
| Origen de células T | Poblaciones linfocitarias<br>(% de linfocitos totales) |                  |                  |
|---------------------|--|------------------|------------------|
|                     | CD3 <sup>+</sup>                                       | CD4 <sup>+</sup> | CD8 <sup>+</sup> |
| Control             | 93±6   | 78±6             | 13±2             |
| CMS                 | 95±5   | 81±7             | 15±3             |

Análisis de citometría de flujo realizado en fracciones enriquecidas de LT obtenidas de bazo de animales control y CMS.

Los resultados están expresados como porcentaje de los linfocitos totales y representan la media ± E.S. de cuatro experimentos independientes.

## 7-1-g INDUCCIÓN DE LA PROLIFERACIÓN POR TRATAMIENTO CON PMA Y IONÓFORO DE $\text{Ca}^{2+}$

Es sabido que el tratamiento químico con el éster de forbol PMA combinado con el ionóforo de calcio ionomicina estimula la proliferación de LT. Para analizar la señalización río abajo de PKC se estudió el efecto de PMA y ionomicina en la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en LT de ratones control y CMS. Como se observa en la Figura 24 la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina fue similar en linfocitos de ambas condiciones a diferencia de la respuesta proliferativa inducida por mitógeno la cual fue significativamente menor en las células de animales CMS.



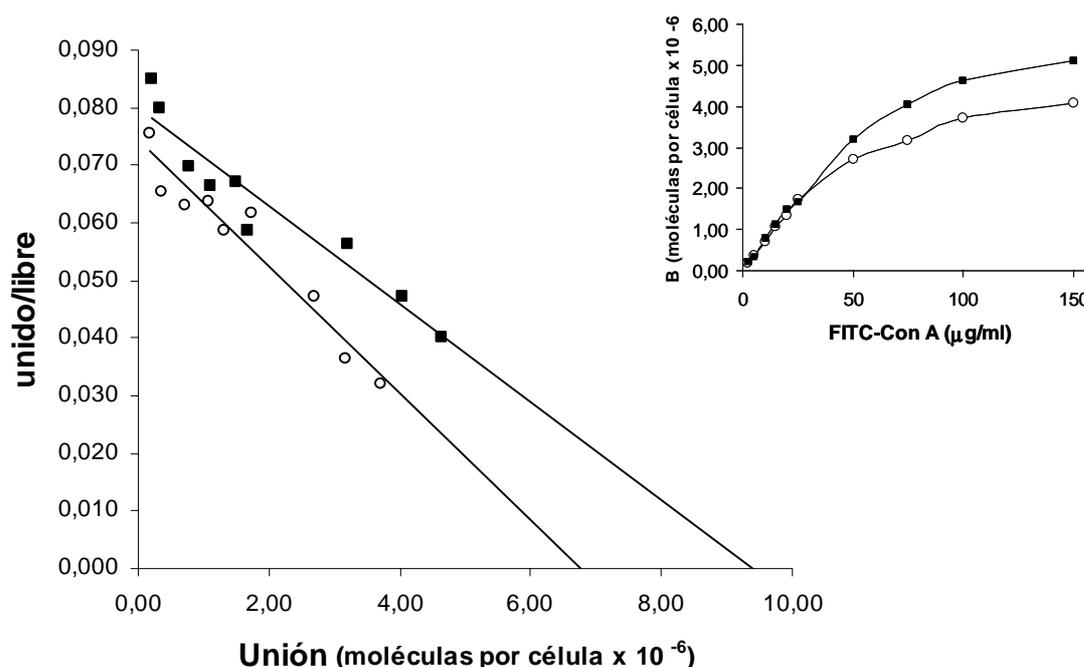
**FIGURA 24: PROLIFERACIÓN DE LT INDUCIDA POR PMA Y IONOMICINA**

Células provenientes de animales control y CMS fueron cultivadas en condiciones basales o fueron estimuladas con Con A (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o con PMA (2 nM) más ionomicina (2  $\mu\text{M}$ ). Se determinó la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina luego de 3 días de cultivo. Los resultados mostrados representan la media  $\pm$  ES de cinco experimentos independientes realizados por triplicado.

\*  $p < 0.01$  respecto del valor control.

## 7-1-h ANÁLISIS DEL NÚMERO DE SITIOS DE UNIÓN A CON A

Para investigar si uno de los posibles mecanismos involucrados en la alteración de la señalización intracelular observada en linfocitos de animales CMS era la modificación de la unión de Con A a su receptor, se realizó un ensayo de unión usando FITC-Con A. La Figura 25 muestra un estudio de unión representativo en fracciones enriquecidas en LT de animales control y CMS. Como puede observarse, la unión de FITC-Con A fue específica y saturable dentro del rango de concentraciones usadas (2-150  $\mu\text{g/ml}$ ) de Con A. El análisis de Scatchard de las curvas de unión mostró que los linfocitos CMS tienen un mayor número de receptores para Con A pero este aumento no fue significativo respecto de células control ( $B_{\text{max}}$ : control  $7.6 \pm 0.5 \times 10^6$  sitios por célula, CMS  $8.7 \pm 0.8 \times 10^6$  sitios por célula). Ambos grupos mostraron una afinidad similar al ligando ( $K_d$ : control  $0.76 \pm 0.09$  pM, CMS  $0.98 \pm 0.11$  pM).



**FIGURA 25: UNIÓN DE FITC-CON A A FRACCIONES ENRIQUECIDAS DE LT**

Linfocitos T de animales control (círculos) y expuestos a CMS (cuadrados) fueron incubados con concentraciones crecientes de FITC-Con A. Los datos mostrados representan un experimento representativo de tres realizados por duplicado en forma independiente. Cada experimento fue realizado con un pool de tres animales de cada grupo.

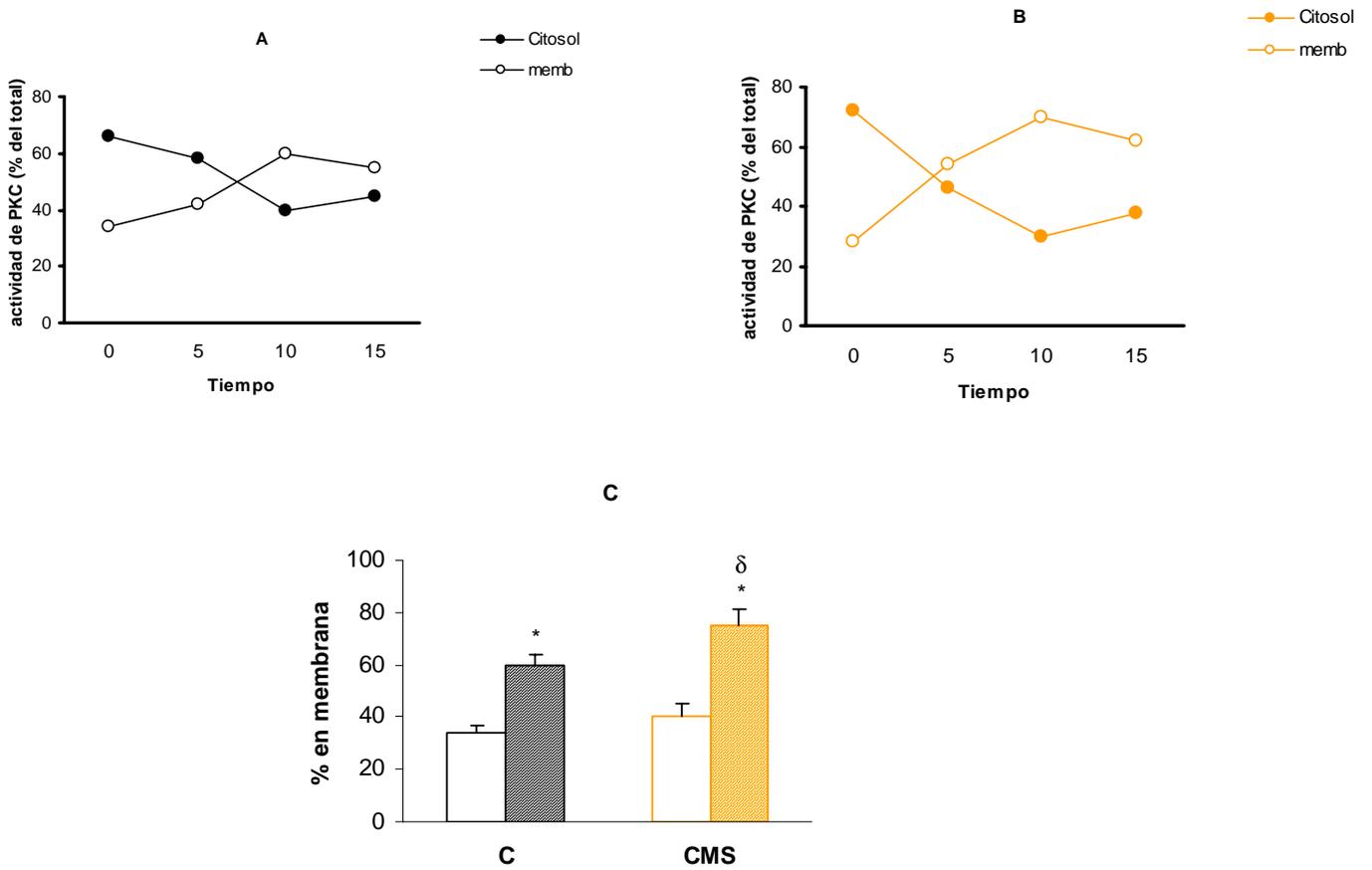
## **7-2 SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN LINFOCITOS B**

El LPS, que a altas concentraciones estimula la activación policlonal de LB a través de TLR4 es utilizado como modelo de Ag T-independiente-1 para estudiar la respuesta proliferativa de este tipo celular así como también las vías de señalización que se activan río debajo de este receptor. Muchas de estas señales son compartidas con las que se activan vía BCR. Sin embargo, si la unión de un Ag a BCR no es seguida de señales co-estimuladoras la proliferación policlonal de LB es moderada y se ve acompañada de una alta tasa de apoptosis.

La vía de TLR no estimula el influjo de  $Ca^{2+}$  y por eso no será estudiado este parámetro en esta sección.

### **7-2-a ACTIVIDAD DE PKC EN LB**

De la misma manera que en punto 6-1-b, se determinó la actividad enzimática de PKC en fracciones citosólicas y de membrana de suspensiones de LB provenientes de animales control y CMS. Como se observa en la Figura 26, cuando los LB fueron estimulados, se observó un cambio en la distribución subcelular de la enzima dependiente del tiempo. La actividad de PKC disminuyó en la fracción citosólica y fue recuperada en la fracción particulada tanto en células de animales control como en CMS. Sin embargo, en estas últimas la translocación de la actividad hacia la membrana fue mayor que la observada en células control (Figura 26).



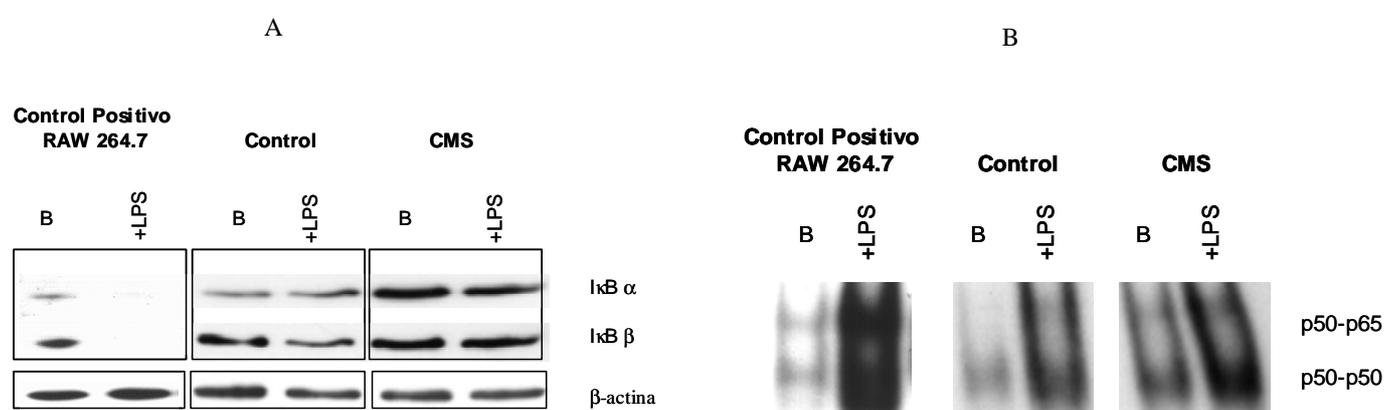
**FIGURA 26: TRANSLOCACIÓN DE PKC EN LINFOCITOS B**

Se estimularon LB de animales control (A) y CMS (B) con LPS (30 µg/ml) y se determinó la actividad de PKC en la fracción soluble (citosol) y en la particulada (membrana) a los tiempos indicados. Se muestra un experimento representativo de seis realizados en forma independiente con un animal de cada grupo. (C) Se muestra la actividad media ± ES de PKC en la fracción particulada en condiciones basales (barras abiertas) y estimulada por 15min con LPS (barras rayadas) expresada como el porcentaje de la actividad total de PKC (citosol + membrana).

\* p < 0.05 respecto del valor basal,  $\delta$  p < 0.05 respecto del correspondiente control.

## 7-2-b ALTERACIÓN DE LA VÍA NF- $\kappa$ B EN LB POR EXPOSICIÓN A ESTRÉS CRÓNICO

Para de investigar si la alteración de la actividad de PKC inducida por estrés provocaba alguna alteración de la activación del factor nuclear  $\kappa$ B se estudió la presencia de su inhibidor ( $I\kappa$ B) en extractos citosólicos (Figura 27 A) y de NF- $\kappa$ B en extractos nucleares (Figura 27 B) tras estimulación durante 30 minutos con LPS. La activación de LB con LPS indujo una disminución de  $I\kappa$ B en citosol y promovió la translocación hacia el núcleo de NF $\kappa$ B. Células B de animales CMS mostraron una mayor activación de NF $\kappa$ B luego de la estimulación mitogénica que la observada en células provenientes de animales controles.

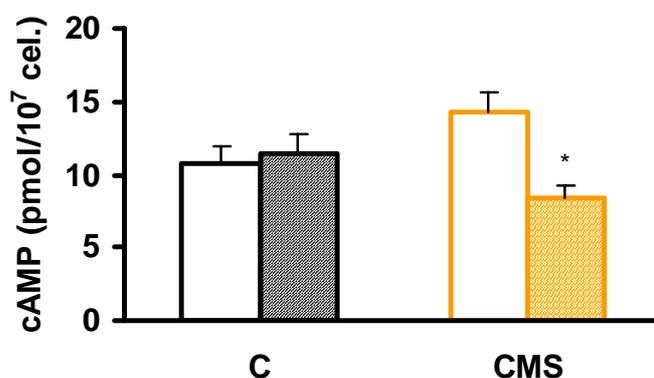


**FIGURA 27: PRESENCIA DE  $I\kappa$ B  $\alpha$  e  $I\kappa$ B  $\beta$  EN CITOSOL Y DE NF-  $\kappa$ B EN NÚCLEO**

Células B provenientes de animales control y CMS fueron estimuladas con LPS por 30 min. Se determinaron los niveles proteicos de  $I\kappa$ B-  $\alpha$  e  $I\kappa$ B-  $\beta$  en extractos citosólicos (A). Se utilizó  $\beta$ -actina como control interno de carga. La actividad de NF- $\kappa$ B fue determinada en fracciones nucleares (B). Extractos citosólicos y nucleares provenientes de la línea celular de macrófagos RAW 264.7 en condiciones basales y estimulados con LPS fueron usados como controles positivos. Se muestran los resultados obtenidos en un experimento representativo de cuatro realizados en forma independiente con un animal de cada grupo.

### 7-2-c CONCENTRACIÓN DE cAMP EN LINFOCITOS B

Con la intención de evaluar el efecto de la exposición a estrés crónico sobre la vía cAMP/PKA, se estudiaron los cambios en los niveles intracelulares de cAMP en linfocitos B normales (C) y CMS no estimulados y estimulados durante 30 minutos con LPS. Como se observa en la Figura 28, la estimulación mitogénica no varió significativamente los niveles de cAMP en LB control. En cambio, se observó una disminución significativa del mismo en LB de animales CMS.



**FIGURA 28: CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE cAMP EN LB**

Células de animales control (C) y CMS fueron incubadas solas (barras vacías) o en presencia de LPS por 30 min (barras rayadas) y se determinaron los niveles de cAMP.

Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de 6 experimentos realizados por duplicado.

\*  $p < 0.01$  respecto del correspondiente valor basal.

## **8- INFLUENCIA DE CORTICOSTERONA Y CATECOLAMINAS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE**

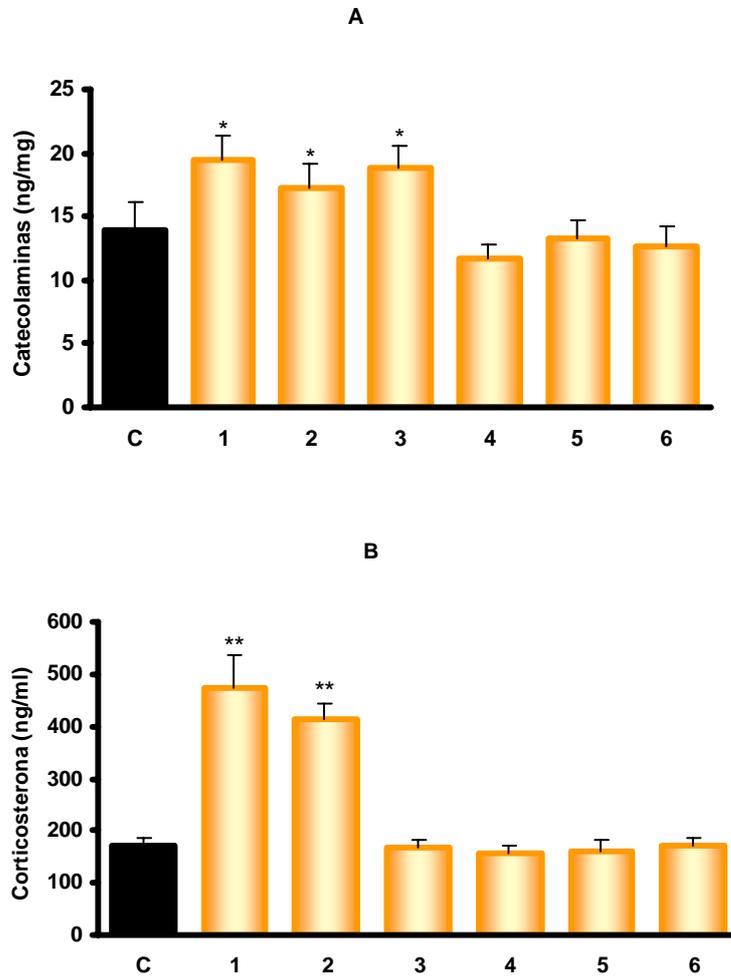
La activación del eje adrenal y el sistema simpático juega un papel prominente en la respuesta adaptativa al estrés. Tanto las catecolaminas como los GCs, hormonas clásicamente asociadas al mantenimiento de la homeostasis bajo condiciones de estrés, son capaces de modular la respuesta inmune a través de los receptores que expresan los linfocitos para ambas hormonas. A fin de analizar la influencia de estas hormonas sobre la respuesta inmune se analizaron sus niveles en animales normales y sometidos a estrés crónico así como su efecto sobre la reactividad linfocitaria.

### **8-1 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA Y CATECOLAMINAS**

Se determinó el contenido de catecolaminas en bazo y corticosterona en plasma luego de la exposición a CMS. Como se observa en la Figura 29 A, los niveles de catecolaminas en bazo aumentaron durante las primeras semanas de exposición a CMS y recuperaron los valores basales a partir de la tercera semana.

Los animales sometidos a CMS mostraron un aumento significativo de los niveles séricos de corticosterona durante las primeras 3 semanas de exposición a CMS, patrón similar al de los niveles de catecolaminas (Figura 29 B).

Luego de 3 semanas, los niveles séricos de corticosterona recuperaron los valores basales y no mostraron diferencias significativas respecto de los controles.



### FIGURA 29: CONCENTRACIÓN DE CATECOLAMINAS Y CORTICOSTERONA

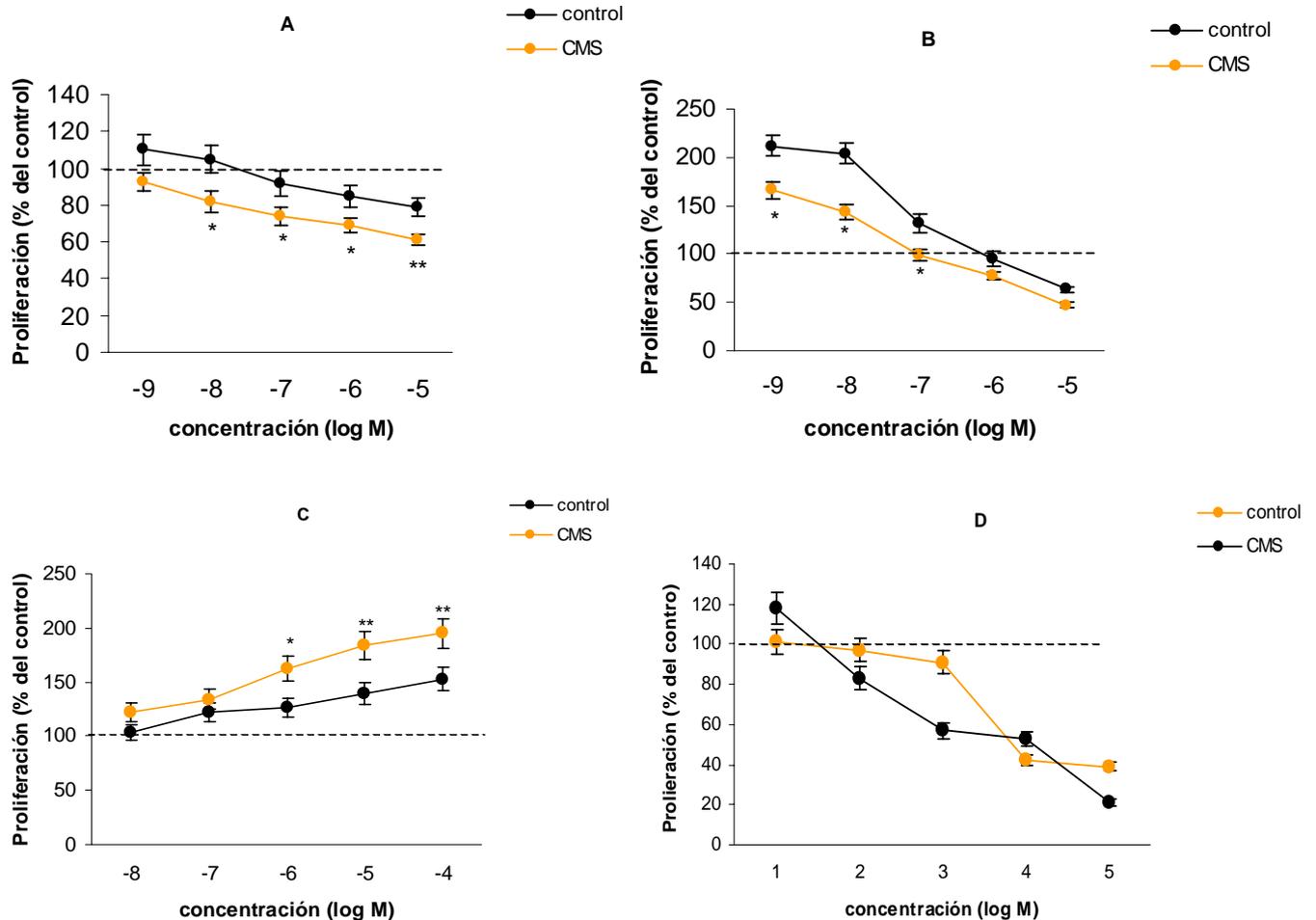
Se determinaron los niveles de catecolaminas en bazo (A) y de corticosterona (B) en suero en animales control (■) y sometidos al esquema de estrés crónico (■) durante 1 a 6 semanas. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de al menos cuatro animales de cada grupo.

\*  $p < 0.005$  respecto del control.

\*\*  $p < 0.001$  respecto del control.

## 8-2 EFECTO DE LAS HORMONAS DEL ESTRÉS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE

El efecto de las hormonas depende no sólo de su concentración sino también de la sensibilidad que tengan las células a la acción de dichas hormonas. Por tal motivo, se analizó la sensibilidad de LT y LB a ambas hormonas evaluando la reactividad linfocitaria en ausencia y presencia de adrenalina y corticosterona. A tal fin se realizaron cultivos de linfocitos esplénicos estimulados con 2 µg/ml de Con A para LT y con 30 µg/ml de LPS para LB y se determinó la proliferación por incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. La influencia de las hormonas se evaluó por co-incubación con adrenalina o corticosterona en un rango de concentraciones desde 10<sup>-9</sup> M hasta 10<sup>-5</sup> M. Como puede observarse en la Figura 30 A, bajas concentraciones de adrenalina no ejercieron un efecto significativo sobre la respuesta proliferativa de linfocitos T normales, mientras que altas concentraciones indujeron un efecto inhibitorio. Sin embargo, en linfocitos de animales CMS se observó un efecto inhibitorio para todas las concentraciones de adrenalina utilizadas. Se observaron resultados similares en presencia de nor-adrenalina (no mostrados). Por otra parte, la co-incubación con corticosterona indujo un efecto estimulante a bajas concentraciones y un efecto inhibitorio a altas concentraciones sobre la proliferación de LT normales. Para los linfocitos de animales CMS se observó un menor efecto estimulante y un mayor efecto inhibitorio de la corticosterona sobre la proliferación celular (Figura 30 B). Para LB, todas las concentraciones de adrenalina analizadas indujeron un aumento de la respuesta proliferativa tanto para animales control como CMS pero siendo significativamente mayor para estos últimos (Figura 30 C). Por otra parte, bajas concentraciones de corticosterona ejercieron un leve efecto estimulante sobre la respuesta proliferativa de LB normales, mientras que altas concentraciones indujeron un claro efecto inhibitorio. No se observaron diferencias significativas en el efecto de la hormona sobre LB de animales CMS con respecto al control.



**FIGURA 30: EFECTO DE LA ADRENALINA Y LA CORTICOSTERONA SOBRE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA**

Linfocitos T (A y B) estimulados con Con A y linfocitos B (C yD) estimulados con LPS provenientes de animales control y CMS fueron co-incubados con las concentraciones de adrenalina (A y C) o corticosterona (B y D) indicadas y se determinó la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Los resultados están expresados como porcentaje de incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en el pico de proliferación en ausencia de adrenalina o corticosterona (proliferación basal). Los valores para la proliferación basal fueron: 38543±5572 dpm para LT y 23596±3450 dpm para LB de animales control y 16332±2671 dpm para LT y 63532±9652 para LB de CMS. Ninguna de las hormonas afectó la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina de las células no estimuladas (no mostrado). Los datos representan la media ± ES de cinco experimentos independientes realizados por triplicado con un animal de cada grupo.

\* p<0.05 respecto del control.

\*\* p<0.01 respecto del control.

## 9- CAMBIOS EN EL BALANCE TH1/TH2

Se ha sugerido la existencia de cambios a nivel del balance TH1/TH2 en la Depresión. Por tal motivo se determinó la producción de citoquinas de ambos tipos celulares cuya presencia ha sido implicada en las patologías psiquiátricas, principalmente IL-6 (citoquina tipo TH2) e IL-2, IFN- $\gamma$  (citoquina tipo TH1).

### 9-1 DETERMINACIÓN DE INTERLEUQUINAS

La concentración de IL-2, IL-6 e INF- $\gamma$  en el suero de los animales normales y CMS no pudo ser determinada debido a que los niveles fueron inferiores a la sensibilidad de la técnica utilizada.

Se analizaron entonces los sobrenadantes de linfocitos T y de macrófagos de animales normales y CMS estimulados o no con mitógenos durante 24 hs.

Como se observa en al Tabla 3, no pudieron detectarse niveles basales de IL-2 en el sobrenadante de LT provenientes de animales control o CMS. Los valores basales de esta CQ en sobrenadantes de macrófagos no fueron significativamente distintos en ambas condiciones. Tampoco se observaron diferencias significativas entre células control y CMS, tanto en LT como en macrófagos, cuando fueron estimuladas con mitógenos.

Para el caso de IL-6, se observó un aumento significativo, tanto de los niveles basales como de los niveles tras el estímulo mitogénico, en sobrenadantes de linfocitos CMS respecto de su respectivo valor control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles obtenidos en sobrenadantes de macrófagos ni en condiciones basales ni tras estimulación.

Por último, no se obtuvieron valores detectables basales de IFN- $\gamma$  en ninguna de las condiciones estudiadas. Los niveles de esta CQ fueron significativamente menores en sobrenadantes de LT estimulados mitogénicamente provenientes de animales CMS respecto de animales control mientras que los niveles IFN- $\gamma$  no mostraron diferencias significativas en cultivos de macrófagos estimulados.

Tabla 3  
Determinación de interleuquinas

| CQs           | Control     |              |                |                  | CMS            |                 |                |                  |
|---------------|-------------|--------------|----------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|------------------|
|               | LT          |              | M $\phi$       |                  | LT             |                 | M $\phi$       |                  |
|               | B           | +PHA         | B              | +PHA             | B              | +PHA            | B              | +PHA             |
| IL-2          | ND          | 225 $\pm$ 55 | 35 $\pm$ 7     | 186 $\pm$ 84     | ND             | 346 $\pm$ 31    | 28 $\pm$ 12    | 179 $\pm$ 79     |
| IL-6          | 71 $\pm$ 28 | 148 $\pm$ 13 | 2708 $\pm$ 172 | 48451 $\pm$ 7138 | 2015 $\pm$ 33* | 3035 $\pm$ 251* | 3500 $\pm$ 315 | 55067 $\pm$ 4490 |
| IFN- $\gamma$ | ND          | 742 $\pm$ 87 | ND             | 488 $\pm$ 84     | ND             | 241 $\pm$ 15**  | ND             | 736 $\pm$ 219    |

Sobrenadantes de cultivos de LT y macrófagos provenientes de animales control y CMS fueron analizados para determinar la concentración (pg/ml) de IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$  por radioinmunoensayo.

\* $p < 0.05$  respecto del correspondiente valor control.

\*\* $p < 0.001$  respecto del correspondiente valor control.

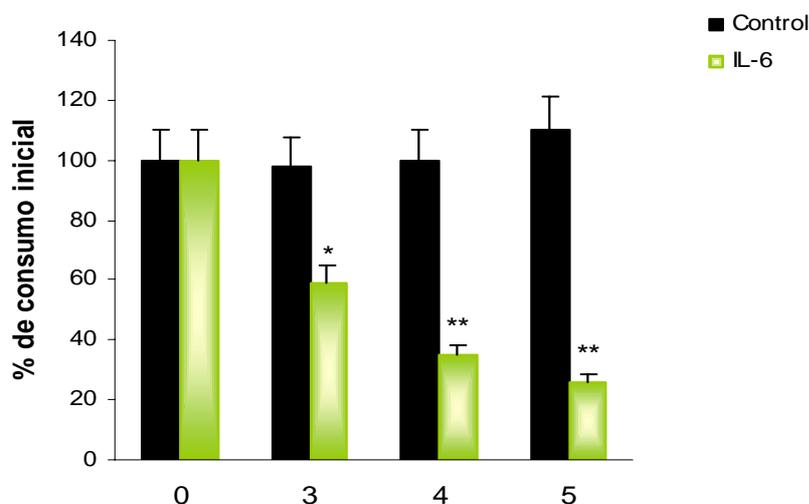
ND, no detectable.

## 9-2 ACCIÓN DE LA INTERLEUQUINA-6 SOBRE EL COMPORTAMIENTO

Según lo determinado en el punto anterior y con el fin de analizar si los cambios conductuales observados por exposición a estrés crónico eran reproducibles por la administración de la CQ cuya producción está aumentada en estas condiciones, se estudiaron distintos parámetros conductuales tras el tratamiento durante 5 días con IL-6 (200 ng/ratón).

### 9-2-a ANHEDONIA

De la misma manera que en el punto 1-1 se determinó el consumo de una solución de sacarosa en animales control y animales que recibieron el tratamiento de IL-6. El consumo se registró en una fase previa y durante los cinco días que duró el tratamiento. Como se observa en la Figura 31, al igual que en los animales CMS, el consumo de sacarosa disminuyó significativamente en animales tratados respecto de los controles a partir del tercer día de tratamiento.



**FIGURA 31: ALTERACIÓN DEL CONSUMO DE SACAROSA INDUCIDO POR TRATAMIENTO CON IL-6**

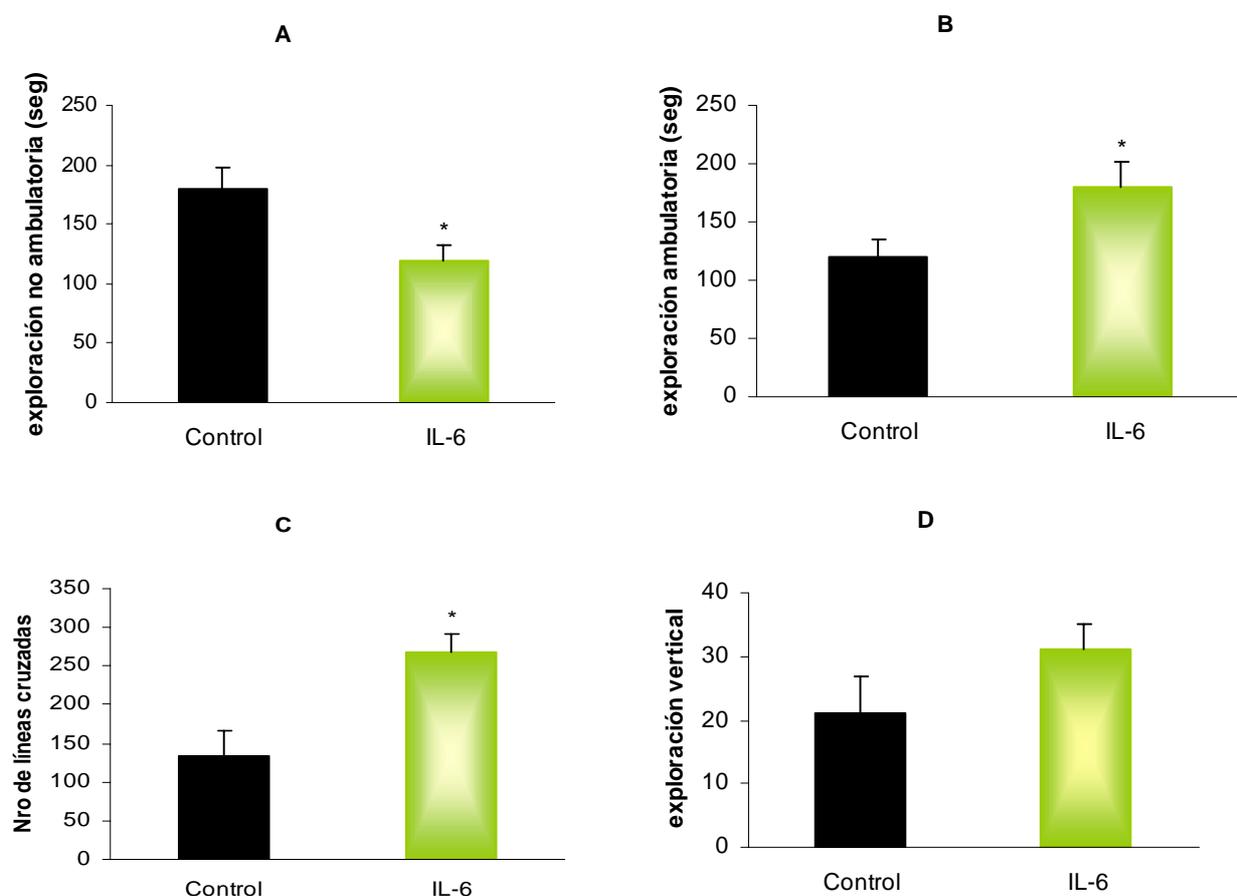
Se registró el consumo de una solución de sacarosa en animales control y tratados con IL-6 durante cinco días. Se muestran los valores como porcentaje respecto del valor determinado en el último test de la fase de entrenamiento (0) en los días 3, 4 y 5 de tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  ES de cinco animales de cada grupo.

\* $p < 0.05$  respecto del correspondiente valor basal.

\*\* $p < 0.001$  respecto del correspondiente valor basal.

### 9-2-b ACTIVIDAD EXPLORATORIA EN UN AMBIENTE NOVEDOSO

Otro análisis efectuado en animales tratados con IL-6 fue el de la actividad exploratoria. Animales control y tratados con IL-6 fueron sometidos al test de Campo Abierto durante 5 min. Se registró el tiempo que los animales dedicaron a la actividad no ambulatoria (Figura 32 A), a la actividad ambulatoria (Figura 32 B), el número de líneas cruzadas (Figura 32 C) y el número de exploraciones verticales (Figura 32 D).



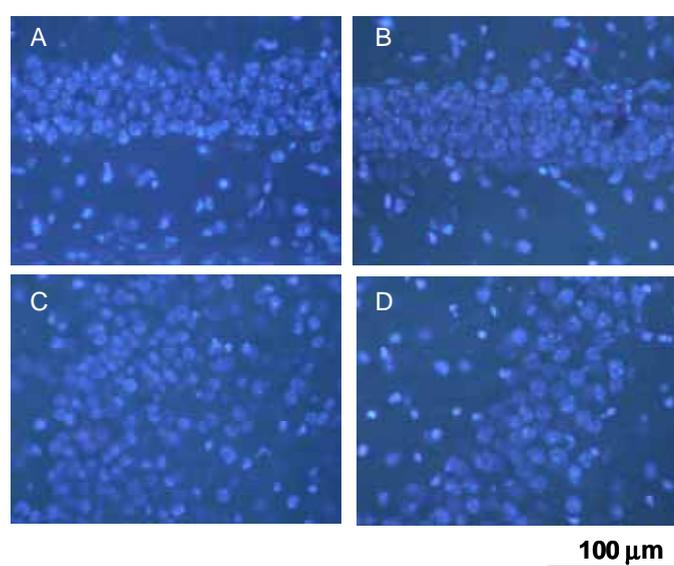
**FIGURA 32: EFECTOS DE TRATAMIENTO CON IL-6 EN LA ACTIVIDAD EXPLORATORIA.**

Ratones control (■) expuestos a CMS durante 6 semanas (■) fueron sometidos al test de campo abierto durante 5 min y se determinó la exploración no-ambulatoria (A), la exploración ambulatoria (B), actividad locomotora (C), y la exploración vertical (D). Los resultados muestran la media  $\pm$  ES de determinaciones realizadas en 5 animales de cada grupo.

\* $p < 0.05$  respecto del valor control.

### 9-2-c CAMBIOS ESTRUCTURALES EN HIPOCAMPO

Al igual que en el punto 4-1 se analizaron cortes coronales de hipocampos provenientes de animales control (Figura 33 A y C) y tratados con IL-6 (Figura 33 B y D) y se evaluó la presencia de alteraciones estructurales. Como puede observarse en la Figura 33 los animales tratados con IL-6 presentaron una disminución en el número de neuronas en la zona CA3.



**FIGURA 33: HISTOLOGÍA DE HIPOCAMPO NORMAL Y TRATADO CON IL-6 POR TINCIÓN DE HOESCHT.**

En hipocampos de animales control (A y C) y tratados con IL-6 (B y D) se evaluaron los cambios estructurales en las zonas CA1 (A y B) y CA3 (C y D). Los cortes se observaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia Axiphot Carl Zeiss usándose una máquina fotográfica digital Nikon de 4,5 megapíxeles. Las áreas histológicas fueron elegidas al azar y muestran un experimento representativo de 5 realizados con un animal de cada grupo.

## DISCUSIÓN

---

El sistema inmune fue originalmente considerado como un sistema de defensa autónomo y autorregulado, crítico para defender al organismo de agentes no reconocidos como propios. De hecho, hace tiempo el sistema inmune era definido como una “agencia de defensa” independiente de otros sistemas. Sin embargo, las investigaciones realizadas en su mayoría durante los últimos 25 años han revelado que los procesos inmunoregulatorios están influenciados por el sistema nervioso central e, inversamente, que las funciones neurales y endocrinas y el comportamiento están influenciados por el sistema inmune.

La psiconeuroinmunología es el estudio de las interacciones entre el comportamiento, las funciones neurales y endocrinas y los procesos del sistema inmune que forman una compleja red que funciona concertadamente para mantener el equilibrio del organismo. Cada componente de esta red evoluciona para desempeñar funciones especializadas monitoreando y respondiendo a información derivada de los otros componentes. Cualquier factor que interrumpe este delicado equilibrio deriva en patologías cuyos signos clínicos pueden manifestarse predominantemente en uno de los sistemas pero, en realidad, toda la red se encuentra alterada. Entre los factores que pueden afectar la homeostasis del organismo, el estrés cobra especial importancia en la actualidad. El estrés puede ser definido como un síndrome o conjunto de reacciones fisiológicas no específicas del organismo a diferentes agentes del ambiente que son percibidos como nocivos. El resultado fisiológico de la respuesta al estrés involucra cambios en casi todos los órganos y funciones del cuerpo. Estos cambios permiten evitar el peligro. A corto plazo, no son dañinos. Pero si la situación persiste, las consecuencias pueden ser desfavorables para el organismo.

En este trabajo se investigó cómo el estrés altera el SI y, consecuentemente, si estas alteraciones afectan la funcionalidad del SNC y si se manifiestan a través de cambios morfológicos, neuroquímicos y conductuales. En este contexto, una de las patologías con mayor incidencia asociada al estrés es la depresión. De acuerdo a la clasificación del DSM-IV, la depresión es un trastorno que se caracteriza por la presencia de al menos dos síntomas cardinales: la pérdida de placer (anhedonia) y el ánimo decaído (American Psychiatric Association, 1994). Los estudios realizados en pacientes con depresión arrojan resultados difíciles de interpretar debido a la heterogeneidad del muestreo que no es fácil de controlar. En tal sentido, la utilización de modelos animales permite arribar a conclusiones más robustas. En los animales no es posible evaluar objetivamente el ánimo decaído pero sí el estado anhedónico.

Para comprender las alteraciones de la respuesta inmune asociadas a situaciones de estrés y la participación de esta desregulación en la fisiopatología de la depresión, se utilizó un modelo de estrés crónico moderado (CMS) que consiste en la aplicación de factores estresores de intensidad moderada de manera crónica, secuencial e impredecible durante varias semanas. Este es un modelo atractivo pues ofrece una simulación real de la etiología de la depresión y puede ser considerado un modelo realista y válido de esta patología (Willner, 1997 a y b). La relevancia del modelo de estrés crónico moderado es apoyada por dos observaciones interesantes: 1) el déficit en la capacidad de experimentar placer es revertido por el tratamiento con las principales clases de drogas antidepresivas pero no con una gran variedad de drogas no antidepresivas; 2) el tratamiento crónico con antidepresivos afecta el comportamiento sólo de animales estresados pero no afecta la conducta de animales no estresados, al igual que se observa en humanos (Wilner y col., 1992; D'Aquila y col., 1997; Willner, 1997 a y b)

En primer lugar, validamos el modelo de CMS como modelo de Depresión analizando la presencia de anhedonia y su reversión con antidepresivos. Observamos el desarrollo de un estado anhedónico en animales expuestos a CMS a partir de la cuarta semana así como también la pérdida progresiva de la masa corporal. Estas observaciones son similares a las encontradas por Monelon y col. (1995) donde el consumo de una solución de sacarosa 2% se vio significativamente disminuido tras la exposición crónica a estresores.

Entre las drogas utilizadas como antidepresivos se encuentran las que modifican la actividad serotoninérgica las cuales constituyen el grupo de agentes modernos más usados para tratar la depresión (Mann, 2005). La tianeptina es un antidepresivo atípico que incrementa la captación de serotonina. A fin de validar el modelo de CMS desarrollado en nuestro bioterio se estudió el efecto de la administración de tianeptina en la alteración de los parámetros antes analizados en animales expuestos al esquema de estrés crónico. Tanto el consumo de la solución azucarada como el peso recuperaron los valores basales después de cuatro semanas de tratamiento manteniendo estos niveles en semanas posteriores.

La observación de la actividad exploratoria en un ambiente novedoso permite evaluar el estado general del animal así como también su nivel de alerta y distintas variables vinculadas con su estado emocional. Así, observamos un aumento en la actividad locomotora acompañado de una disminución en el tiempo que el animal permanece en actividad no-ambulatoria. Estas observaciones contradicen

las de Willner (1997a y b) quien encontró una actividad locomotora disminuida en animales sometidos a CMS. Esta discrepancia puede deberse a diferentes factores como ser la sensibilidad al estrés de distintas cepas de ratones, diferencias en los detalles del procedimiento de aplicación de los estresores, sexo y edad de los animales, etc. Asimismo, la duración del período previo al comienzo del esquema de estrés en que el animal está solo en su jaula puede influir en la intensidad de la interacción social que ocurre durante la exposición al mismo (Willner, 1997 a y b). Además, hay trabajos que documentan un aumento en la actividad locomotora durante los tests de Campo Abierto tras la exposición a CMS (Benelli y col., 1999; Dunčko y col., 2001), característica que es un síntoma presente en la depresión en humanos (American Psychiatric Association, 1994).

Otro parámetro que se ve alterado en la depresión es la capacidad de aprendizaje y memoria que está correlacionada con la severidad del cuadro (Porter y col., 2003). De acuerdo con nuestros resultados, se encontró que los animales CMS tenían una latencia de escape hacia el compartimento oscuro menor que los animales control en el test de evitación pasiva. Este resultado revela un déficit en la memoria asociativa en los animales sometidos a estrés crónico.

Estudios realizados en la década del '60 describieron que la depresión reflejaba un desequilibrio en las concentraciones de aminas biógenas en el sistema nervioso central. Si bien la noradrenalina y la serotonina son las aminas biógenas principalmente asociadas a la fisiopatología de la depresión, también la dopamina podría desempeñar un papel en este trastorno. El hipocampo es una estructura vulnerable a los efectos del estrés. También es una estructura maleable importante que está involucrada en ciertos tipos de aprendizaje y memoria y expresa altos niveles de receptores para esteroides adrenales (McKittrick y col., 1995; Graeff y col., 1996, McEwen, 2005). El hipocampo jugaría un papel crítico en la fisiopatología de la depresión. Existen dos líneas principales de evidencias que avalan este rol: primero, muchas de las funciones del hipocampo se ven alteradas en la depresión y segundo, muchas de estas funciones están reguladas por el sistema serotoninérgico (Dremencov y col., 2003). Se analizaron los niveles de distintas aminas en hipocampos de animales control y CMS. Se encontró un aumento significativo en los niveles de serotonina pero no se observaron diferencias significativas en el nivel de su metabolito ni en la actividad serotoninérgica estimada según la relación 5-HIAA/5-HT. Asimismo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de adrenalina y nor-adrenalina no pudiéndose detectar niveles de dopamina ni de su metabolito dihidroxifenilacetato (DOPAC). Ha sido reportado que el estrés por inmovilización induce un incremento en la síntesis y/o metabolismo de serotonina en algunas áreas límbicas (Dunn, 2000;

Shimizu y col., 1989). Específicamente, se ha descrito que el estrés crónico por inmovilización induce una actividad serotoninérgica aumentada en el hipocampo (Torres y col., 2002) mientras que un estudio reciente demostró que la exposición a CMS induce una disminución en la concentración tisular de 5-HT sin observarse un incremento en su recambio (Li y col., 2003). Asimismo, ha sido descrito tanto el aumento (Lopez y col., 1998) como la disminución (Papp y col., 1994) de la expresión de receptores para 5-HT del subtipo 5-HT<sub>1A</sub> tras la exposición a estrés crónico. Si bien no es posible establecer un paralelismo entre el aumento o disminución de la función serotoninérgica y los síntomas depresivos, este sistema está claramente involucrado en esta patología.

Algunos estudios de imágenes de estructuras cerebrales mostraron una disminución del volumen del hipocampo asociada a la cronicidad de la depresión (Bremner, 2002). Analizamos la estructura de hipocampos provenientes de animales control y CMS observando una disminución en el espesor de las zonas CA1 y CA3 en estos últimos. Estudios realizados en hipocampo en respuesta a exposición repetida de estrés muestran la existencia de múltiples formas de plasticidad estructural y funcional, desde cambios en la potenciación a largo plazo (LTP) y neurogénesis en el giro dentado hasta la remodelación de dendritas de las neuronas piramidales de la zona CA3 (McEwen, 2001). La plasticidad de la zona CA3 actuaría como una matriz autoasociativa capaz de relacionar y almacenar patrones de información proyectados desde el hipocampo hacia el cortex entorrinal (Steffenach y col., 2002). Nuestros resultados están de acuerdo con estos y otros estudios que demuestran que la pérdida de volumen en el hipocampo tendría una significación funcional asociada a la pérdida de memoria (Sheline y col., 2002)

La respuesta fisiológica al estrés involucra cambios neuroquímicos y hormonales que pueden influenciar la reactividad de las células del sistema inmune. El efecto de un estresor sobre la respuesta inmune depende de una variedad de factores tales como la duración y el tipo de estresor, así como también de la respuesta inmunológica evaluada. Se han descrito alteraciones inmunológicas asociadas al estrés y enfermedades psiquiátricas, particularmente a la depresión mayor (Miller, 1998; Maes, 1995; Reiche y col., 2004). Los linfocitos T y B son las principales células efectoras del SI. Analizando la respuesta proliferativa de estas células encontramos que ésta estaba claramente alterada tras cuatro semanas de exposición a CMS. Los resultados mostraron específicamente una disminución de la respuesta proliferativa inducida por mitógenos en LT y un aumento de la respuesta a mitógenos en LB. Estas observaciones no dependieron del órgano utilizado para evaluar la proliferación linfocitaria inducida por mitógenos. Kubera y col. (1998)

describieron una disminución de la actividad de células NK así como de la respuesta proliferativa a Con A, a IL-1 y al Ac monoclonal anti-CD-3 y un aumento en la respuesta proliferativa a LPS y a PKW inducida por estrés crónico. El estrés crónico ha sido asociado con alteraciones de la inmunidad mediada por células (Dhabhar y McEwen, 1996; Dhabhar y McEwen, 1997). De la misma manera, se ha descrito que el estrés induce una predisposición a padecer a infecciones y cáncer (Sheridan, 1998; Glaser y col., 1994; Ben-Eliyahu y col., 1991; Holden y col., 1998; Kiecolt-Glaser y col., 2002)

Para correlacionar nuestras observaciones *in vitro*, estudiamos la respuesta humoral *in vivo* tras la inoculación de Ags T-dependientes (GRC) e independientes (LPS). Observamos que la exposición a CMS tiene un claro efecto inmunosupresor sobre la producción de Ac tipo IgG no afectando la producción de Ac tipo IgM. Estos resultados indican que el estrés afecta particularmente el cambio de isotipo, típico de la respuesta humoral a antígenos T-dependientes. Si bien no existen reportes sobre la respuesta humoral tras un desafío antigénico en la depresión, varios estudios han indicado una alteración de la producción de Ac ante un desafío antigénico en el contexto de situaciones de estrés. Así, se han observado menores títulos de Acs en respuesta al virus de la hepatitis B en personas que tienen a su cargo pacientes o familiares con Alzheimer (Glaser y col., 1998; Jabaajj y col., 1996; Kiecolt-Glaser y col., 1996). Estudios realizados utilizando modelos genéticos de estrés han reportado evidencias de una disminución en la producción de Acs y una alteración en el cambio de isotipo en respuesta a la inmunización con un Ag T-dependiente (Murray y col., 2001). Asimismo, se ha demostrado que el estrés crónico por inmovilización induce una disrupción severa en la habilidad funcional de los linfocitos a proliferar y a producir CQs y Acs contra la toxina del tétano (Tournier y col., 2001). Las consecuencias psicológicas e inmunológicas del estrés crónico persisten aún cuando desaparece la causa del estrés.

Resultó de interés correlacionar los cambios en las respuestas estudiadas con las correspondientes señales intracelulares implicadas en la activación celular, en especial, el nivel intracelular de calcio, la actividad de proteína quinasa C (PKC), la participación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y la actividad de proteína quinasa A (PKA) evaluando los niveles de cAMP.

En LT, la activación del receptor T induce un incremento en la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  e involucra la acción de dos quinasas muy bien caracterizadas funcionalmente, PKC y PKA, que tienen funciones opuestas. La activación de PKC promueve la proliferación celular (Szamel y col. 1998) mientras que la activación de la PKA dependiente de cAMP la inhibe (Aandahl y col., 2002). Nuestros

resultados indican que el estrés crónico induce una inhibición en el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en LT estimulados con Con A. Si bien el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  *per se* no es suficiente para inducir la proliferación linfocitaria (Gelfand y col., 1987), la reducción del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  atenúa marcadamente la respuesta inducida por mitógenos indicando que el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre sería un evento esencial temprano en este tipo de respuesta (Maltsev y col., 1994; Nel, 2002).

En referencia a PKC, se sabe que esta enzima está normalmente presente en el citoplasma y transloca a la membrana plasmática tras la unión de un Ag al TCR. Esta rápida activación de PKC es crítica para que la célula T entre en la fase proliferativa del ciclo celular (Spitaler y Cantrell, 2004). Como era de esperarse, tras la activación de LT con Con A, se observó una distribución subcelular de la enzima desde el citosol hacia la membrana. Sin embargo, la distribución subcelular de PKC en linfocitos CMS fue menor que la encontrada en los linfocitos control. Es posible que la reducción en el incremento de la concentración de calcio observada en LT de animales CMS conlleve a una reducción en la actividad de PKC. Inicialmente se estableció que la familia de PKC era un importante blanco en el proceso de activación de LT porque el tratamiento con ésteres de forbol junto con el ionóforo de calcio ionomicina podía causar directamente la activación celular. Durante los últimos años se han evidenciado múltiples receptores celulares para ésteres de forbol incluyendo importantes moléculas de señalización de LT. Sin embargo, el hecho de que la regulación negativa farmacológica de la PKC impida la activación y la funcionalidad de LT afirma el importante rol de esta enzima en la activación celular (Sun y col., 2000). Actualmente se conoce que las isoformas  $\alpha$  y  $\theta$  de PKC son reclutadas a la parte interna de la membrana plasmática minutos después de la unión del ligando al TCR, un evento que es crucial para la activación de NF- $\kappa$ B (Altman y col., 2000; Trushin y col., 2003). Nuestros resultados indicaron que linfocitos T de animales CMS presentaron una translocación menor tanto de PKC  $\alpha$  como de PKC  $\theta$  luego de la estimulación. De acuerdo con estos resultados, se observó una menor activación de NF- $\kappa$ B en estas células. La activación de NF- $\kappa$ B es requerida para la proliferación inducida por Ag, la producción de CQs y la supervivencia de LT, procesos que son fundamentales para la respuesta inmune adaptativa (Sun y col., 2000). La menor activación de NF- $\kappa$ B observada tras la estimulación de LT de ratones CMS podría explicar la disminución de la respuesta proliferativa de estas células bajo condiciones de estrés crónico.

En cuanto a la vía de cAMP-PKA, encontramos que la Con A induce una disminución en los niveles intracelulares de cAMP. Esta disminución fue menor en células T de animales CMS. Existe una relación inversa entre los niveles de cAMP y la proliferación linfocitaria (Tamir y col., 1996; Kane y col.,

2002). No está claro si una disminución en los niveles de cAMP induce una respuesta proliferativa. De hecho, algunos estudios reportaron que el cAMP bloquea la progresión pero no el inicio de la proliferación de LT. Sin embargo, en la mayoría de los modelos de activación de LT, la proliferación linfocitaria está acompañada de una disminución de los niveles de cAMP (Skalhegg y col., 1998). El efecto de la estimulación con Con A sobre los niveles de cAMP podría reflejar un efecto sobre la actividad de la adenilato ciclasa o sobre la actividad de las fosfodiesterasas de cAMP. Varios estudios han demostrado que los ésteres de forbol alteran la respuesta del sistema adenilato ciclasa, un efecto mediado probablemente por PKC (Duhant y col., 2002). Previamente, en nuestro laboratorio se encontró que la activación de PKC inducida por incubación con PMA llevaba a una disminución significativa de los niveles de cAMP tras la estimulación con Con A. Sin embargo, la inhibición de la actividad de PKC con staurosporina no revirtió la habilidad del mitógeno de reducir la producción de cAMP. No obstante, la regulación negativa de PKC por el tratamiento con PMA indujo un aumento significativo tanto en los niveles basales como tras estimulación con Con A de cAMP en linfocitos (Edgar y col., 1999). Además, se encontró que el IBMX, un inhibidor de la fosfodiesterasa, impide la disminución de los niveles de cAMP inducidos por Con A. Así, la activación de PKC no sería esencial para inducir la disminución de los niveles de cAMP tras la estimulación con Con A pero jugaría un papel importante en la prevención del aumento de los niveles de cAMP lo que conduciría a la inhibición de los procesos requeridos para una proliferación linfocitaria normal. En este trabajo, no encontramos un efecto significativo de la exposición a estrés crónico sobre los niveles basales de la actividad de PKC y de cAMP. Además, la inhibición de la actividad de PKC impidió totalmente la disminución de los niveles de cAMP tras la estimulación mitogénica tanto en linfocitos control como en los provenientes de animales CMS. Adicionalmente, no encontramos diferencias significativas en el entrecruzamiento de las vías de PKC y cAMP en LT controles y CMS (dato no mostrados).

Debido a que distintos estudios habían reportado que el estrés crónico podría llevar a una reducción selectiva de las subpoblaciones linfocitarias (Herbert y Cohen, 1993; Cohen y Herbert, 1996) analizamos los subtipos de células linfoides en animales control y CMS. No encontramos variaciones significativas en el conteo de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en compartimentos linfoides de animales control y CMS. La alteración en el conteo de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> está relacionada con varias enfermedades y están asociada con estresores agudos, depresión y estrés crónico. Estudios realizados en personas que cuidan pacientes con la enfermedad de Alzheimer mostraron tanto similitud (Kiecolt-Glaser y col., 1991; Mills y col., 1997) como diferencias (Naliboff y col., 1991) en el conteo de células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> respecto de los controles. Se ha propuesto que el número de subpoblaciones linfocitarias específicas

podría estar afectado por diferencias en las concentraciones y combinaciones de adrenalina, noradrenalina y cortisol lo que podría explicar las diferencias reportadas en el número de linfocitos en sangre durante condiciones de estrés (Dhabhar y McEwen, 1999). Podemos concluir que la alteración en la respuesta proliferativa de LT estimulados mitogénicamente de animales CMS y en la vía de señalización intracelular no fue debida a una redistribución de subpoblaciones linfocitarias. Por otra parte, la combinación de ionomicina y PMA estimula directamente las vías que involucran PKC y  $Ca^{2+}$  sin necesidad de interactuar con un receptor de superficie. Los resultados indicaron que el tratamiento simultáneo con un activador de PKC y un ionóforo de  $Ca^{2+}$  fue capaz de inducir la misma respuesta proliferativa en linfocitos T de animales control y CMS. Así, los caminos involucrados en la proliferación celular río abajo de PKC no estarían afectados por el estrés crónico. Estos resultados sugieren que la interacción de los receptores de superficie con sus ligandos o el subsecuente acoplamiento a los eventos tempranos de señalización podrían estar afectados por exposición a estrés crónico. El ensayo de unión de a FITC-Con A mostró que células T de animales CMS no presentaban una alteración del número de receptores ni de la afinidad por el ligando, permitiendo concluir que la interacción con el receptor de superficie no estaría involucrada en la alteración de la señalización intracelular observada en linfocitos T de animales CMS tras estimulación mitogénica. Sin embargo, tendría que considerarse la participación de otros receptores de superficie, particularmente de la molécula co-estimuladora CD28, que coopera con el complejo TCR/CD3 para producir la activación completa de la células T. Según los resultados obtenidos, podemos concluir que el estrés crónico induce en LT una disminución en el aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular tras la estimulación con Con A que conlleva a una disminución de la translocación de PKC  $\alpha$  y  $\theta$  y, consecuentemente, a una menor activación de NF- $\kappa$ B. Además, la menor activación de PKC podría estar influyendo en el camino inhibitorio de cAMP-PKA. Esta alteración de la señales intracelulares gatilladas por Con A estarían contribuyendo a la menor activación de los linfocitos T inducida por el estrés.

Para el caso de los linfocitos B, el LPS, que a altas concentraciones estimula la activación policlonal de a través de TLR4, es utilizado como modelo de Ag T-independiente-1 para estudiar la respuesta proliferativa de este tipo celular así como también las vías de señalización que se activan río abajo de este receptor. Muchas de estas señales son compartidas con las que se activan vía BCR. La vía de TLR4 no estimula directamente el influjo de  $Ca^{2+}$  y por eso este parámetro no fue estudiado. Cuando los LB fueron estimulados con LPS, observamos una mayor activación de PKC en linfocitos de animales CMS respecto a la observada en linfocitos de animales control. De acuerdo con estos

resultados, la activación inducida por LPS de células B provenientes de animales CMS fue acompañada por una mayor disminución de I $\kappa$ B en citosol y una mayor translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B, respecto de células control.

Se ha sugerido que los ligandos de TLR pueden romper la tolerancia de los linfocitos B, ya sea estimulando a las células B nativas o co-estimulando otras células B autorreactivas (Peng, 2005). La exposición constante a los ligandos TLR (ej. LPS) sin el desarrollo de autoinmunidad sugiere la presencia *in vivo* de mecanismos protectores que la previenen. Nuestras observaciones del aumento de la respuesta proliferativa de linfocitos B a LPS inducida por el estrés permitiría proponer un posible mecanismo por el cual el estrés sería un factor que favorecería la aparición de episodios de autoinmunidad. (Marques-Deak y col., 2005). De hecho, nuestro grupo encontró presencia de auto-Ac dirigidos contra receptores colinérgicos muscarínicos que podrían estar implicados en la recurrencia característica de los trastornos asociados a cambios del estado de ánimo (Cremaschi y col., 2004).

Es importante entender que el estrés no está sólo en nuestras mentes si no que es una respuesta real del sistema nervioso con descarga de diferentes químicos y hormonas al torrente sanguíneo. La respuesta al estrés se compone de elementos cognitivos emocionales que por mecanismos neuroendocrinos y conductuales influyen en el SI. La respuesta al estrés tiene dos efectores principales, el eje HPA y el sistema nervioso simpático (Mello Ade y col., 2003; Pariante, 2003; Miller y O'Callaghan, 2002). Las células del SI, así como las células de otros sistemas expresan receptores para hormonas y neurotransmisores (Roszman y Brooks, 1997; Elenkov y col., 2000). La activación de estos receptores resulta en la modulación de la reactividad inmunitaria.

Por tal motivo, se investigó la participación de las catecolaminas y los glucocorticoides en la alteración de la respuesta inmune de LT y LB. Observamos un incremento de los niveles de corticosterona y catecolaminas durante las primeras semanas de exposición al esquema de CMS retornando a niveles similares al control después de la tercera semana de exposición. Ayensu y col. (1995) reportaron altas concentraciones de corticosterona luego de cuatro semanas de exposición a estrés crónico en ratas. Sin embargo, otros autores no han encontrado niveles aumentados de esta hormona luego de prolongadas situaciones estrés (Azpiroz y col., 1999). Además, este grupo no observó diferencias en los niveles de nor-adrenalina en el hipotálamo ni el hipocampo de animales bajo condiciones de CMS. Estos datos sugieren que no habría una activación adrenal (cortical o medular) en estos animales. Se ha propuesto que existe una respuesta adaptativa del eje HPA en

presencia de concentraciones altas y prolongadas de glucocorticoides (Azpiroz y col., 1999; Pignatelli y col., 2000). Más aún, se ha demostrado que el estrés crónico induce un estado hipersupresivo de la secreción de corticosterona en respuesta al estrés agudo causado por la habituación parcial y la adaptación a los estresores (Mizoguchi y col., 2001). Podría ser similar para el caso de la secreción de nor-adrenalina. Si tenemos en cuenta que la disminución en la respuesta proliferativa y la falla en la producción de Acs T-dependientes se manifiesta tras seis semanas de exposición a CMS, podemos concluir que no existe correlación entre la alteración en la respuesta inmune y los niveles de catecolaminas y corticosterona. Sin embargo, encontramos alteraciones en la sensibilidad de los linfocitos CMS al efecto de las hormonas del estrés. Por un lado, los LT presentaron una mayor sensibilidad al efecto inhibitorio ejercido por catecolaminas y corticosterona. En cambio los LB mostraron únicamente una mayor sensibilidad al efecto estimulador de las catecolaminas.

En humanos, el estrés crónico psicosocial sufrido por personas que cuidan pacientes con demencia ha sido asociado con una sensibilidad reducida de linfocitos T a glucocorticoides cuando son estimulados mitogénicamente *in vitro* (Bauer y col., 2003). Sin embargo, Stark y col. (2001), trabajando en un modelo murino, encontraron que un estresor psicosocial inducía resistencia al efecto de glucocorticoides en macrófagos esplénicos pero no en LT provenientes del mismo órgano. Por otro lado, Bauer y col. (2001) mostraron que esplenocitos de animales estresados crónicamente por re-exposición a un factor estresor eran más sensibles a la aplicación exógena de dexametasona que animales estresados pero no re-expuestos al estresor. Este grupo también reportó que alteraciones de la función inmune y de la regulación esteroidea asociadas con depresión no estaban relacionadas con niveles basales elevados de cortisol (Bauer y col., 2003). Estos autores concluyen que la falta o disminución de la respuesta linfocitaria al efecto de esteroides estaría asociada sólo con la depresión resistente al tratamiento.

Es razonable pensar en interacciones complejas que ocurren durante la exposición crónica al estrés y es difícil entender qué alteración en particular de la comunicación immuno-neuroendocrina está asociada a una condición específica. En nuestro modelo, es posible que un incremento temprano en los niveles de catecolaminas y corticosterona estén contribuyendo a la inducción de cambios en la sensibilidad linfocitaria a largo plazo.

Se ha propuesto la existencia de cambios a nivel del balance TH1/TH2 en la Depresión. Se estudiaron entonces, los niveles de IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de linfocitos T y macrófagos de animales normales y CMS estimulados y no estimulados con mitógenos.

En el suero de los animales control y CMS los niveles de estas citoquinas no pudieron ser determinados debido a que los niveles fueron inferiores a la sensibilidad de la técnica utilizada. Los resultados obtenidos a partir del dosaje de interleuquinas en sobrenadantes provenientes de linfocitos y macrófagos estimulados mitogénicamente permitieron concluir que existe una disminución de la producción de IFN- $\gamma$  y un aumento de la producción de IL-6 en linfocitos CMS.

A fin de analizar si este desbalance podía estar implicado en las alteraciones conductuales y estructurales descritas en nuestro modelo de CMS, se trataron ratones con IL-6 durante 5 días. Estos animales presentaron un estado de anhedonia similar al observado en los animales CMS. Asimismo, se observó un aumento en la actividad locomotora y alteraciones estructurales en el hipocampo. Esta citoquina podría estar implicada en la disminución de la capacidad de aprendizaje y memoria encontrada en animales CMS. De hecho, se ha demostrado que el bloqueo de la IL-6 endógena por la administración de un Ac anti-IL-6 mejora significativamente la memoria a largo plazo involucrando a esta citoquina en los mecanismos que controlan la cinética del almacenamiento de información (Balschun y col., 2004).

No está claro a través de qué mecanismo las CQs circulantes en la periferia atraviesan la barrera hematoencefálica a fin de ejercer su efecto sobre el SNC. Si bien se ha propuesto la existencia de transportadores específicos para las CQs encargados del pasaje de estas moléculas a través de la barrera hematoencefálica todavía no está claro si la actividad de estos transportadores es suficiente para alcanzar los niveles de CQs adecuados dentro del SNC capaces de producir los efectos encontrados (Banks y col., 1995). Alternativamente, se han propuesto varios mecanismos indirectos por los cuales las CQs circulantes atravesarían la barrera hematoencefálica para afectar las estructuras del SNC y así alterar la conducta y los procesos de memoria y aprendizaje (Banks y col., 2002). Estos mecanismos incluyen:

- la acción de CQs sobre los órganos circunventriculares, sobre el nervio vago y otros nervios aferentes
- la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a otras sustancias
- el aumento o inducción del pasaje de células inmunes desde la sangre hacia el cerebro

- la alteración en la liberación de alguna otra sustancia que a su vez atravesaría la barrera hematoencefálica y actuaría sobre alguno de estos mecanismos.

Existirían distintos mecanismos por los cuales las CQs podrían inducir depresión. Una posibilidad es que las CQs induzcan el desarrollo de síntomas depresivos modulando la actividad del eje HPA. Las citoquinas son capaces de inducir resistencia a los glucocorticoides, conduciendo a una potencial hiperactividad del eje HPA y a la supresión de la regulación negativa de los GCs sobre la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (Miller y col., 1999). La transmisión neuroquímica representa otro potencial blanco de las CQs. Estas podrían inducir síntomas depresivos regulando negativamente la síntesis de serotonina, mientras que el retardo psicomotor y la anhedonia estarían mediados por el funcionamiento aberrante del ganglio basal, especialmente de su componente dopaminérgico (Capuron y Dantzer, 2003).

Maes y col. (1994) describieron altos niveles plasmáticos de IFN- $\gamma$  en pacientes deprimidos acompañados de una baja disponibilidad de triptofano en plasma. Pocos años más tarde otro grupo diferenció pacientes con y sin tendencias suicidas (Mendlovic y col., 1999) encontrando asociaciones distintas entre tendencia suicida y respuesta inmune tipo TH1 por un lado y predominancia de parámetros del tipo TH2 en pacientes sin tendencias suicidas por otro. Paralelamente, Schwarz y col. (2001) introdujeron una línea de investigación que relaciona los niveles de IFN- $\gamma$  y el metabolismo del triptofano con la tendencia al suicidio. El aminoácido esencial triptofano es el precursor de dos vías metabólicas distintas cuyos productos son la serotonina y la kineurina. La enzima indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) metaboliza el triptofano a kineurina que es catabolizada a ácido quinónico por la enzima kineurina hidroxilasa. Tanto la IDO como la kineurina hidroxilasa son inducidas por IFN- $\gamma$ . Las citoquinas TH2 IL-4 e IL-10 inhiben el catabolismo del triptofano por IDO inducido por IFN- $\gamma$  (Weiss y col., 1999). La disponibilidad reducida de triptofano en el cerebro inducida por IFN- $\gamma$  llevaría a una deficiencia serotoninérgica.

Entre las citoquinas TH2 la IL-6 ha sido una de las más frecuentemente estudiadas en pacientes que padecen depresión. Dado que la IL-6 no sólo está asociada a una respuesta inmune del tipo TH2 sino que es también un prominente marcador de la actividad monocítica, la combinación de altos niveles de esta citoquina y altos niveles de proteínas de fase aguda, permitiría postular una activación predominante del sistema monocítico/macrofágico en la depresión mayor (Smith, 1991; Smith y Maes, 1995). Por otro lado, existen evidencias de la relación entre altos niveles de IL-6 periféricos y alta

disponibilidad de serotonina en el SNC. La administración intravenosa o intraperitoneal de IL-6 induce no sólo la activación del eje HPA si no también el incremento del metabolismo del triptofano y la serotonina en el cerebro, mientras que no afecta el metabolismo de la nor-adrenalina (Wang y Dunn, 1998). De acuerdo con esto, la IL-6 parecería mediar la activación de eje HPA y del sistema serotoninérgico central tras la administración de LPS (Wang y Dunn, 1999). Así, elevados niveles plasmáticos de IL-6 no encajarían con la hipótesis de la deficiencia de serotonina en la Depresión mayor.

Los resultados de los distintos estudios mencionados sugerirían una relación entre variables inmunológicas, neuroquímicas y clínicas en pacientes con depresión. La tendencia suicida en estos pacientes estaría relacionada con una deficiencia de serotonina en el SNC posiblemente inducida por la activación de IDO mediada por IFN- $\gamma$  mientras que los niveles elevados de IL-6 indicarían un grupo distinto de pacientes con depresión sin una deficiencia en el sistema serotoninérgico (Schwarz y col., 2001).

En este contexto, nuestros resultados indicarían que en el modelo de depresión utilizado en este trabajo la exposición a estrés crónico induciría un desbalance hacia TH2, evidenciado por el aumento de IL-6 proveniente de linfocitos T, que estaría de acuerdo con el aumento en la biodisponibilidad de serotonina en el hipocampo de animales sometidos a CMS.

En términos de psicopatología, la demostración de la sensibilización cruzada entre citoquinas y estresores, implica que estas alterarían el circuito cerebral cambiando su sensibilidad a estímulos o eventos subsecuentes aparentemente no relacionados. Por ejemplo, la IL-6, que *per se* tiene un efecto menor en la locomoción, es capaz de potenciar el efecto estimulante de las anfetaminas sobre la actividad locomotora en ratas (Zalcman y col., 1999). De acuerdo a esto, el aumento de IL-6 y la exposición a estímulos estresores actuarían de manera sinérgica produciendo alteraciones conductuales, neuroquímicas y morfológicas a nivel del SNC.

Los resultados discutidos en este trabajo de tesis se resumen esquemáticamente en la Figura 34.

En conclusión, el estrés y la depresión, dos males de nuestro tiempo asociados a los hábitos y modos de vida de la sociedad occidental actual, tienen una base biológica común que justifica la elevada frecuencia en que aparecen asociados. Si bien la investigación en el campo de la

Psiconeuroinmunología ha crecido vertiginosamente, nuestros conocimientos acerca de la compleja interacción entre el Sistema Nervioso Central, el Sistema Endocrino y el Sistema Inmune es aún limitado.

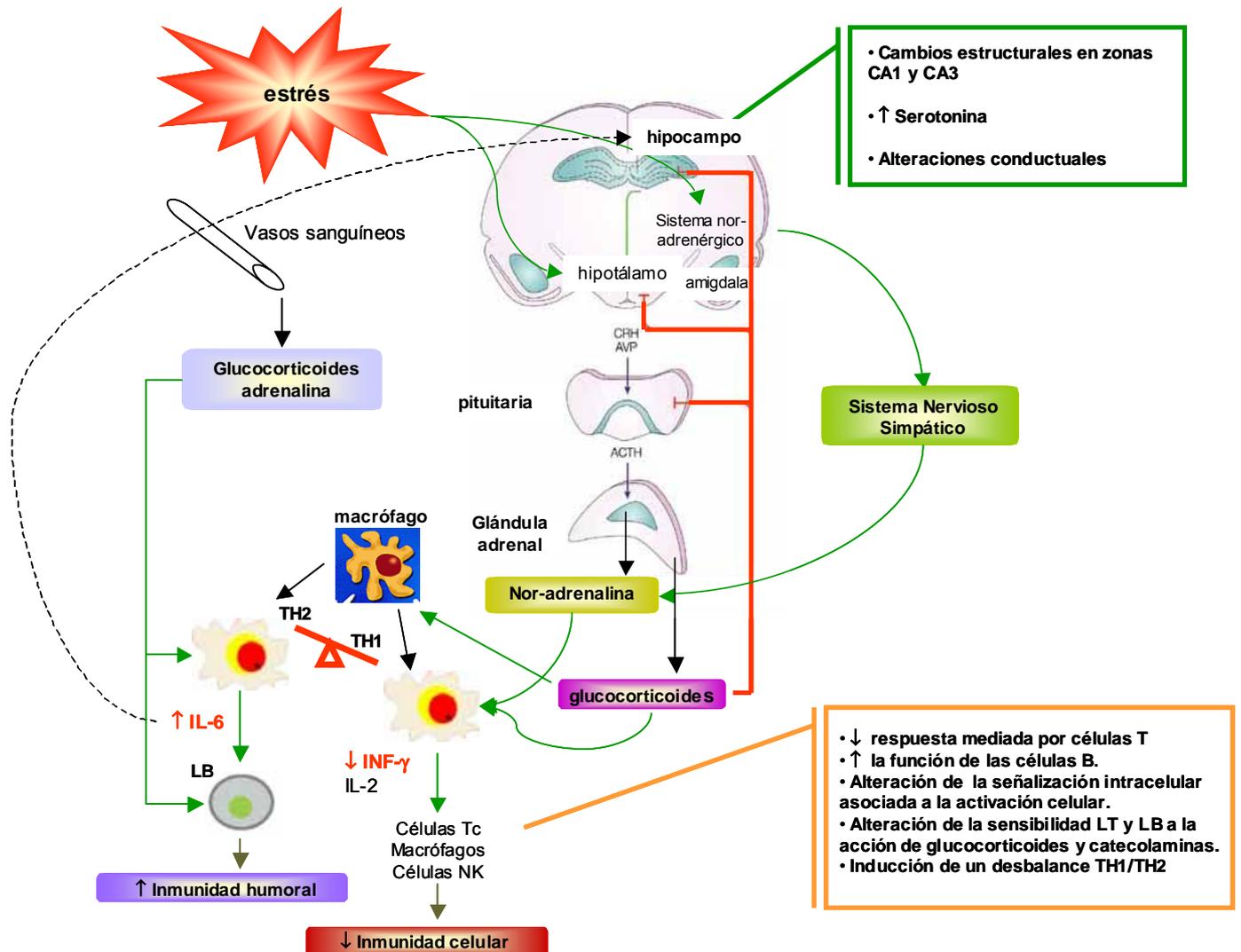
Los resultados emergentes de este trabajo de tesis son una clara evidencia de cómo la perturbación del SI, en este caso por exposición a estrés crónico, conduce a cambios neuroquímicos y estructurales que consecuentemente afectan la conducta, el aprendizaje y la memoria. Asimismo, puntualiza la importancia de la categorización de los parámetros inmunológicos a la hora de definir subgrupos dentro de los desórdenes psiquiátricos que, en general, son altamente heterogéneos en su composición. Por otra parte, constituyen una base biológica que podría explicar la mayor susceptibilidad a padecer trastornos inmunológicos que presentan las personas que sufren este tipo de desórdenes. Este tipo de abordaje, que relaciona los mecanismos inmunológicos con las alteraciones neuroquímicas y las variables clínicas, podría ser de suma utilidad para encontrar terapias específicas destinada a pacientes pertenecientes a los diversos subgrupos que existen dentro de los diferentes desórdenes psiquiátricos.

## COMENTARIO FINAL

Cualquier cambio puede ser el origen de una situación de estrés por la necesidad de adaptación que supone. Que un hecho sea percibido como una amenaza depende sobre todo de cada persona. Lo que para unos puede ser un problema, para otros es una ventaja, o incluso pura rutina. Los factores psicológicos y emocionales son los principales condicionantes en esta percepción pero también la educación o incluso la herencia genética.

Esta diferencia en la percepción de los peligros deja abierta una oportunidad para empezar a prevenir el estrés. Aumentar nuestra tolerancia a los peligros que nos rodean permitirá controlar el punto a partir del cual se disparan esos mecanismos. Obviamente, un animal salvaje nunca dejará de ser una amenaza efectiva (siempre es mejor estar estresado que muerto) pero podemos aprender a relajarnos mientras esperamos nuestro turno en el banco, en un embotellamiento de tráfico o mientras escribimos una tesis doctoral.

FIGURA 34: ESQUEMA DE INTERACCIÓN PROPUESTO



## CONCLUSIONES

---

- La exposición a estrés crónico moderado:
  - induce cambios conductuales (anhedonia, aumento de actividad locomotora, déficit en el aprendizaje y la memoria asociativa).
  - induce cambios estructurales y neuroquímicos en el hipocampo, una de las estructuras involucradas en procesos de aprendizaje y memoria.
  - altera la respuesta inmune. Específicamente, disminuye la respuesta mediada por células T y aumenta la función de las células B.
  - Altera la señalización intracelular asociada a la activación celular.
  - Altera la sensibilidad de las células T y B a la acción de glucocorticoides y catecolaminas.
  - Induce un desbalance TH1/TH2 evidenciado por el aumento de la producción de IL-6 y una disminución en la producción de IFN- $\gamma$  por células T.
  
- La administración periférica de IL-6 induce cambios conductuales y estructurales similares a los observados tras exposición a estrés crónico.

La exposición a estrés crónico provoca alteraciones a nivel del Sistema Inmune que contribuyen al desarrollo de cambios conductuales, neuroquímicos y estructurales a nivel del Sistema Nervioso Central. Además, constituyen una base biológica para explicar la mayor susceptibilidad a padecer enfermedades infecciosas, cáncer y enfermedades autoinmunes asociada a este tipo de situación.

## REFERENCIAS

---

- Aandahl EM, Moretto WJ, Haslett PA., Vang T, Bryn T, Tasken K y col.. Inhibition of antigen-specific T cell proliferation and cytokine production by protein kinase A type I. *J. Immunol.* 169: 802-808, 2002.
- Abbas AK, Lichtman EH. *Cellular and molecular immunology* W.B. Saunders, eds. Philadelphia. 1995.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 4<sup>th</sup> edition, New York: Garland Publishing, 2002.
- Alonso R, Griebel G, Pavone G, Stemmelin J, Le Fur G, Soubrie P. Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. *Mol Psychiatry* 9:278-86, 2004.
- Altman A., Isakov N and Baier G. Protein kinase C theta: A new essential superstars on the T cell stage. *Immunol. Today* 21:567-573, 2000.
- Anisman H, Merali Z, Poulter MO, Hayley S. Cytokines as a precipitant of depressive illness: animal and human studies. *Curr Pharm Des.* 11:963-72, 2005.
- Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol.* 18:309-45, 2000.
- Atanackovic D, Brunner-Weinzierl MC, Kroger H, Serke S, Deter HC. Acute psychological stress simultaneously alters hormone levels, recruitment of lymphocyte subsets, and production of reactive oxygen species. *Immunol Invest.* 31:73-91, 2002.
- Ayelli-Edgar V, Cremaschi G, Sterin-Borda L and Genaro AM. Altered expression of autonomic neurotransmitter receptors and proliferative responses in lymphocytes from a chronic mild stress model of depression: effects of fluoxetine. *Brain, Behav. Immun.* 16:333-350, 2002.
- Ayensu WK, Pucilowski O, Mason GA, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowski DS. Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference and corticosterona levels in Flinders lines of rats. *Physiol. Behav.* 57:165-169, 1995.
- Azpiroz A, Fano E, Garmendia L, Arregi A, Cacho R, Beitia G, Brain PF. Effects of chronic mild stress (CMS) and imipramine administration, on spleen mononuclear cell proliferative response, serum corticosterone level and brain norepinephrine content in male mice. *Psychoneuroendocrinology* 24:345-61, 1999.
- Baier G, Telford D, Giampa L, Coggeshall KM, Baier-Bitterlich G, Isakov N, Altman A. Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the PKC kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 268:4997-5004, 1993.
- Balschun D, Wetzel W, Del Rey A, Pitossi F, Schneider H, Zuschratter W, Besedovsky HO. Interleukin-6: a cytokine to forget *FASEB J* 18:1788-90, 2004.
- Banks WA, Farr SA, Morley JE. Entry of blood-borne cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. *Neuroimmunomodulation.*;10:319-2, 2002-2003.
- Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 2:241-8, 1995.

- Bauer, ME, Perks P, Lightman SL, Shanks N. Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. *Physiol. Behav.* 73:525–532, 2001.
- Bauer ME, Papadopoulos A, Poon L, Perks P, Lightman SL, Checkley S, Shanks N. Altered glucocorticoid immunoregulation in treatment resistant depression. *Psychoneuroendocrinology* 28, 49-65, 2003.
- Bauer ME. Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress* 8:69-83, 2005.
- Bauman GP, Bartik MM, Brooks WH and Roszman TL. Induction of cAMP-dependent protein kinase (PKA) activity in T cells after stimulation of the prostaglandin E2 or the beta-adrenergic receptors: relationship between PKA activity and inhibition of anti-CD3 monoclonal antibody-induced T cell proliferation. *Cell Immunol* 158:182-194, 1994.
- Beavo JA, Rogers NL, Crofford OB, Hardman JG, Sutherland EW and Newman EV. Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3'-5'-monophosphate phosphodiesterase activity. *Mol Pharmacol.* 6:597-603, 1970.
- Beishuizen A, Thijs LG. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J Endotoxin Res.* 9:3-24, 2003.
- Belvisi MG. Regulation of inflammatory cell function by corticosteroids. *Proc Am Thorac Soc.* 1:207-14, 2004.
- Ben-Eliyahu S, Yirmiya R, Liebeskind JC, Taylor A, Gale RP. Stress increases metastatic spread of a mammary tumor in rats: evidence for mediation by the immune system. *Brain Behav Immun;* 5:193-205, 1991.
- Benelli A, Filaferro M, Bertolini A, Genedani S. Influence of S-adenosyl-L-methionine on chronic mild stress-induced anhedonia in castrated rats. *Brit. J. Pharmacol.* 127: 645-654, 1999.
- Benou C, Wang Y, Imitola J, VanVlerken L, Chandras C, Karalis KP, Khoury SJ. Corticotropin-releasing hormone contributes to the peripheral inflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 174:5407-13, 2005.
- Berg JM. DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 57:1065–1068, 1989.
- Berki T, Palinkas L, Boldizsar F, Nemeth P. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int Immunol.* 14:463-9, 2002.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325, 1993.
- Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A.. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 232: 977– 980, 1986.
- Beyer JL, Krishnan KR. Volumetric brain imaging findings in mood disorders. *Bipolar Disord;* 4:89-104, 2002.
- Bijsterbosch, MK., Meade CJ, Turner GA, and Klaus GG. B lymphocyte receptors and polyphosphoinositide degradation. *Cell* 41:999-1006, 1985.
- Bishop GR, Jaso-Friedmann L, Evans DL. Activation-induced programmed cell death of nonspecific cytotoxic cells and inhibition by apoptosis regulatory factors. *Cell Immunol.* 199:126-37, 2000.

- Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav* 73:261-71, 2001.
- Blier P y Ward NM. Is there a role for 5-HT<sub>1A</sub> agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry*. 2003 Feb 1;53(3):193-203. *Biol Psychiatry* 53:193-203, 2003.
- Bogerts B, Lieberman JA, Ashtari M, Bilder RM, Degreef G, Lerner G, et al. Hippocampus-amygdala volumes and psychopathology in chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry*; 33:236-46, 1993.
- Bomholt SF, Harbuz MS, Blackburn-Munro G, Blackburn-Munro RE. Involvement and role of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) stress axis in animal models of chronic pain and inflammation. *Stress*. 7:1-14, 2004.
- Bone H and Williams NA. Antigen-receptor cross-linking and lipopolysaccharide trigger distinct phosphoinositide 3-kinase-dependent pathways to NF- $\kappa$ B activation in primary B cells. *Int. Immunol.* 13:807-16, 2001.
- Bonneau RH, Zimmerman KM, Ikeda SC and Jones BC. Differential effects of stress-induced adrenal function on components of the herpes simplex virus-specific memory cytotoxic T-lymphocyte response *J Neuroimmunol.* 82:191-199, 1998.
- Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann. Intern. Med.* 119: 1198–1208, 1993.
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254, 1976.
- Bremner JD, Randall P, Scott TM, Bronen RA, Seibyl JP, Southwick SM, y col. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*;152:973-81, 1995.
- Bremner JD. Structural changes in the brain in depression and relationship to symptom recurrence. *CNS Spectr.* 7:129-30, 135-9, 2002.
- Bruce J, Symington FW, McKearn TJ and Sprent J. A monoclonal antibody discriminating between subsets of T and B cells. *J. Immunol.* 127:2469–2501,1981.
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, y col., International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 46:121-36, 1994.
- Callahan TA, Moynihan JA. Contrasting pattern of cytokines in antigen- versus mitogen-stimulated splenocyte cultures from chemically denervated mice. *Brain Behav Immun.* 16:764-73, 2002.
- Cameron HA y McKay RD. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci*;2:894-7, 1999.
- Cancedda C, Filaci G, Puppo F, Ghio M, Contini P, Indiveri F. Immune homeostasis requires several biologic factors including glucocorticoid hormones. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun;966:49-63, 2002.
- Capuron, L., Ravaut, A. and Dantzer, R.. Early depressive symptoms in cancer patients receiving interleukin 2 and/or interferon -2b therapy. *J. Clin. Oncol.* 18:2143-2151, 2000.

- Capuron L, Gumnick JF, Musselman DL, Lawson DH, Reemsnyder A, Nemeroff CB and Miller AH. Neurobehavioral effects of interferon- in cancer patients: Phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. *Neuropsychopharmacology* 26:643-652, 2002a.
- Capuron L, Ravaut A, Neveu P, Miller AH, Maes M and Dantzer R. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Mol. Psychiat.* 7: 468-473, 2002b.
- Capuron L, Dantzer R. Cytokines and depression: the need for a new paradigm. *Brain Behav Immun.* 17:119-24, 2003.
- Carlson SL, Brooks WH and Roszman TL. Neurotransmitter-lymphocyte interactions: dual receptor modulation of lymphocyte proliferation and cAMP production. *J Neuroimmunol* 24: 155-162, 1989.
- Castanon N, Bluthé RM and Dantzer R. Chronic treatment with the atypical antidepressant tianeptine attenuates sickness behavior induced by peripheral but not central lipopolysaccharide and interleukin-1 in the rat. *Psychopharmacology* 154: 50-60, 2001.
- Chida Y, Sudo N, Kubo C. Social isolation stress exacerbates autoimmune disease in MRL/lpr mice. *J Neuroimmunol*, 158(1-2):138-44, 2005.
- Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, 267:1244-52, 1992 Erratum in: *JAMA*, 268:200, 1992.
- Chung IY, Dong HF, Zhang X, Hassanein NM, Howard OM, Oppenheim JJ, Chen X. Effects of IL-7 and dexamethasone: induction of CD25, the high affinity IL-2 receptor, on human CD4+ cells. *Cell Immunol.* 232:57-63, 2004.
- Cobbold PH and Rink TJ. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem. J.* 248:313-28, 1987.
- Cohen S, Herbert TB. Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. *Annu Rev Psychol.* 47:113- 42, 1996.
- Cremaschi GA, Silberman DM, Barreiro Arcos ML, Ayelli-Edgar V and Genaro AM. Participation of cholinergic muscarinic system in the neuroimmune mechanisms involved in a chronic mild stress model of depression, en *Advances in Psychology Research*, volumen 33, Editor, Serge P. Shohov, pp:121-137, 2004.
- Cupic B, Brejčak D, Gabrilovac J. Receptor-mediated down-regulation of neutral endopeptidase (NEP; EC 3.4.24.11; CD10) on immature B lymphocytes by dexamethasone. *Int J Mol Med.* 15:1023-31, 2005.
- Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M y col. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12796-801, 2001.
- D'Aquila PS, Newton J, Willner P. Diurnal variation in the effect of chronic mild stress on sucrose intake and preference. *Physiol Behav.* 62:421-6, 1997.
- Dantzer R.. Cytokine-induced sickness behavior: Mechanisms and implications. *Ann. NY Acad. Sci.* 933:222-234, 2001.

- Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol.* 500:399-411, 2004.
- Del Rey A., Besedovsky H, Sorkin E. Endogenous blood levels of corticosterone control the immunologic cell mass and B cell activity in mice. *J. Immunol.* 133: 572- 575, 1984.
- DeRijk, R.H. Schaaf M, de Kloet ER. Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81, 103-122, 2002.
- Deuschle M, Sander P, Herpfer I, Fiebich BL, Heuser I, Lieb K. Substance P in serum and cerebrospinal fluid of depressed patients: No effect of antidepressant treatment. *Psychiatry Res.* 136:1-6, 2005.
- Dhabhar FS and McEwen BJ. Acute stress enhances while chronic stress suppresses immune function "in vivo": a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun.* 11:286-306, 1997.
- Dhabhar FS and McEwen BS. Moderate stress enhances, and chronic stress suppresses, cell-mediated immunity "in vivo". *Abstracts Soc Neurosci.* 22:1350-1354, 1996.
- Dhabhar FS, McEwen BS. Changes in blood leukocyte distribution: interactions between catecholamine and glucocorticoid hormones. *Neuroimmunomodulation* 6:213-4, 1999.
- Diagnostic and Statistical Manual (DSM-IV), 4th ed. American Psychiatric Association, Washington, D.C, 1994.
- Dremencov E, Gur E, Lerer B, Newman ME Effects of chronic antidepressants and electroconvulsive shock on serotonergic neurotransmission in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27:729-39, 2003.
- Duhant X, Schandene L., Bruyns C, Gonzalez NS, Goldman M, Boeynaems JM. y col. Extracellular adenine nucleotides inhibit the activation of human CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 169:15-21, 2002.
- Duman RS Structural alterations in depression: cellular mechanisms underlying pathology and treatment of mood disorders. *CNS Spectr.* 7:140-2, 144-7, 2002.
- Dunčo R, Kiss A, Škultéjová I, Rusnak M and Ježová D. Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in response to chronic mild stress rise in male but not in female rats while tyrosine hydroxylase mRNA levels decreased in both sexes. *Psychoneuroendocrinology.* 26:77-89, 2001.
- Dunn AJ. Footshock-induced changes in brain catecholamines and indoleamines are not mediated by CRF or ACTH. *Neurochem. Int.* 37: 61- 69, 2000.
- Dunn AJ and Swiergiel AH. The reductions in sweetened milk intake induced by interleukin-1 and endotoxin are not prevented by chronic antidepressant treatment. *Neuroimmunomodulation* 9:163-169, 2001.
- Edgar VA, Sterin-Borda L, Cremaschi GA. and Genaro AM. Role of protein kinase C and cAMP in fluoxetine effects on human T-cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.* 372: 65-73, 1999.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 52:595-638, 2000.
- Elenkov I. Glucocorticoids and the Th1/Th2 Balance *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1024:138-146, 2004.

- Elenkov IJ, Iezzoni DG, Daly A, Harris AG, Chrousos GP. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. *Neuroimmunomodulation*. 12:255-69, 2005.
- Fearon DT and Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272: 50-53, 1996.
- Feldman RD, Hunninghake GW and McArdle W. Beta-adrenergic receptor-mediated suppression of interleukin 2 receptors in human lymphocytes. *J Immunol* 139: 3355-3359, 1987.
- Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden Ks y col. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: Structure and function. *Immunol. Rev.* 100 :225-260, 1987.
- Felten SY, Madden KS, Bellinger DL, Kruszewska B, Moynihan JA, Felten DL. The role of the sympathetic nervous system in the modulation of immune responses. *Adv Pharmacol.* 42:583-7, 1998.
- Fleshner M, Brennan FX, Nguyen K, Watkins LR, Maier SF. RU-486 blocks differentially suppressive effect of stress on in vivo anti- KLH immunoglobulin response. *Am. J. Physiol.* 271: 1344-1352, 1996.
- Freire-Garabal M, Nunez MJ, Losada C, Pereiro D, Riveiro MP, Gonzalez-Patino E. Y col.. Effects of fluoxetine on the immunosuppressive response to stress in mice. *Life Sci.* 60: 403-413, 1997.
- Frodl T, Meisenzahl EM, Zetzche T, Born C, Groll C, Jager M, y col. Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression. *Am J Psychiatry.* 159:1112-8, 2002.
- Fruman DA, and Cantley LC, Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems. *Semin Immunol.* 14:7-18, 2002.
- Fuchs E, Flugge G. Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals. *Pharmacol Biochem Behav* 73:247-58, 2002.
- Garcia-Alloza M, Tsang SW, Gil-Bea FJ, Francis PT, Lai MK, Marcos B y col. Involvement of the GABAergic system in depressive symptoms of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* PMID: 15996794, 2005.
- Gelfand EW, Mills GB, Cheung RK, Lee JW and Grinstein S. Transmembrane ion fluxes during activation of human T lymphocytes: role of Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and phospholipid turnover. *Immunol. Rev.* 95: 59-87, 1987.
- Genaro AM and Boscá L. Early signals in alloantigen induced B-cell proliferation. Comparison between B-cell triggering by intact allogeneic cells and solubilized alloantigen. *J. Immunol.* 151: 1832-1843, 1993.
- Gladkevich A, Kauffman HF, Korf J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 28:559-76, 2004.
- Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Malarkey WB, Sheridan JF. The influence of psychological stress on the immune response to vaccines. *Ann N Y Acad Sci.* 840:649-55, 1998.
- Glaser R. Stress-associated immune dysregulation and its importance for human health: a personal history of psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun.* 19:3-11, 2005.

- Glaser T, Pearl DK, Kielcot-Glaser J, Malarkey WB. Plasma cortisol levels and reactivation of latent Epstein-Barr virus in response to examination stress. *Psychoneuroendocrinology*; 19: 765-772, 1994.
- Gold, MR and Aebersold R. Both phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 4-kinase products are increased by antigen receptor signaling in B cells. *J. Immunol.* 152:42-50, 1994.
- Gordon IL. Scatchard analysis of fluorescent concanavalin A binding to lymphocytes. *Cytometry* 20:238-244, 1995.
- Goren N, Cuenca J, Martin-Sanz P, Bosca L. Attenuation of NF-kappaB signalling in rat cardiomyocytes at birth restricts the induction of inflammatory genes. *Cardiovasc. Res.* 64:289-297, 2004.
- Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, Deakin JF. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 54:129-41, 1996.
- Graves JD, Campbell J, Krebs E. Protein serine/threonine kinases of the MAPK cascade. En Receptor activation by antigens, cytokines, hormones, and Growth factors. Naor D, De Meyts P, Feldmann M, Schlessinger J, eds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Vol. 766, New York, pp 320-343, 1995.
- Hara H, Wada T, Bakal C, Kozieradzki I, Suzuki S, Suzuki N, y col., The MAGUK family protein CARD11 is essential for lymphocyte activation. *Immunity.* 18:763-75, 2003.
- Heesen C, Koehler G, Gross R, Tessmer W, Schulz KH, Gold SM. Altered cytokine responses to cognitive stress in multiple sclerosis patients with fatigue. *Mult Scler.* 11:51-7, 2005.
- Henning U, Krieger K, Loeffler S, Rivas F, Orozco G, de Castro MG, y col., Increased levels of glucocorticoid receptors and enhanced glucocorticoid receptor auto-regulation after hydrocortisone challenge in B-lymphoblastoids from patients with affective disorders. *Psychoneuroendocrinology* 30:325-32, 2005.
- Herbert TB, Cohen S. Depression and immunity: a meta-analytic review. *Psychol Bull.* 113:472- 86, 1993.
- Holden RJ, Pakula IS, Mooney PA. An immunological model connecting the pathogenesis of stress, depression and carcinoma. *Med Hypotheses.* 51:309-14, 1998.
- Huang YS, Jiang JW, Cao XD, Wu GC. Melatonin enhances lymphocyte proliferation and decreases the release of pituitary pro-opiomelanocortin-derived peptides in surgically traumatized rats. *Neurosci Lett.* 343:109-12, 2003.
- Huitinga I, Erkut ZA, van Beurden D, Swaab DF. Impaired hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity and more severe multiple sclerosis with hypothalamic lesions. *Ann Neurol* 55:37-45, 2004
- Irwin M. En *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, Raven Press, New York, pp: 983-988, 1995.
- Irwin M. Immune correlates of depression. *Adv Exp Med Biol.* 461:1-24, 1999.
- Jabaaij L, van Hattum J, Vingerhoets JJ, Oostveen FG, Duivenvoorden HJ, Baillieux RE. Modulation of immune response to rDNA hepatitis B vaccination by psychological stress. *J. Psychosom. Res.* 41:129-137, 1996.

- Joels M, Karst H, Alfarez D, Heine VM, Qin Y, van Riel E y col. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress*. 7:221-31, 2004.
- Julius MH, Simpson E, Herzerberg LA. A rapid method for the isolation of thymus-derived murine lymphocytes. *Eur J Immunol*. 3:645-649, 1973.
- Kane L.P, Lin J and Weiss A. It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends Immunol*. 23: 413-420, 2002.
- Kasprowicz DJ, Kohm AP, Berton MT, Chruscinski AJ, Sharpe A, Sanders VM. Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta 2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell. *J Immunol*. 165:680-90, 2000.
- Kavelaars A, Kuis W, Knook L, Sinnema G, Heijnen CJ. Disturbed neuroendocrine-immune interactions in chronic fatigue syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 85:692-6, 2000.
- Kent J. SNaRIs, NaSSAs, and NaRIs: new agents for the treatment of depression, *Lancet* 355: 911-918, 2000.
- Kiecolt-Glaser JK, Dura JR, Speicher CE, Trask OJ, Glaser R. in immunity and health. *Psychosom Med*. 53:345-62, 1991.
- Kiecolt-Glaser JK., Glaser R, Gravenstein S, Malarkey WB, Sheridan J. Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3043–3047, 1996.
- Kiecolt-Glaser JK, Robles TF, Heffner KL, Loving TJ, Glaser R. Psycho-oncology and cancer: psychoneuroimmunology and cancer. *Ann Oncol*. 13 Suppl 4:165-9, 2002.
- Kobilka B. Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci*. 15:87-114, 1992.
- Kohm AP, Sanders VM. Suppression of antigen-specific Th2 cell-dependent IgM and IgG1 production following norepinephrine depletion in vivo. *J Immunol*. 162:5299-308, 1999.
- Kohm AP, Sanders VM. Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. *Immunol Today*.21:539-42, 2000.
- Koller MD, Templ E, Riedl M, Clodi M, Wagner O, Smolen JS, Luger A. Pituitary function in patients with newly diagnosed untreated systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 63:1677-80, 2004.
- Kubera M, Basta-Kaim A, Holan V, Simbirtsev A, Roman A, Pigareva N, y col. Effect of mild chronic stress, as a model of depression, on the immunoreactivity of C57BL/6 mice. *Int. J. Immunopharmacol*. 20: 781-789, 1998.
- Kunicka JE, Talle MA, Denhardt GH, Brown M, Prince LA, Goldstein G. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. *Cell Immunol*. 149:39-49, 1993.
- Kurzrock R. Cytokine deregulation in cancer. *Biomed Pharmacother*. 55:543-7, 2001.

- La Baer J and Yamamoto KR. Analysis of the DNA-binding affinity, sequence specificity and context dependence of the glucocorticoid receptor zinc finger region. *J. Mol. Biol.* 239:664-688, 1994.
- Larson SJ, Dunn AJ. Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun.* 15:371-87, 2001.
- Laverty R and Taylor K.. The fluorometric assay of catecholamines and related compounds: improvement and extension to the hydroxyindole technique. *Ann. Biochem.* 22:269-279, 1968.
- Leonard B. Stress, depression and the activation of the immune system. *World J Biol Psychiatry.* 1:17-25, 2000.
- Li JM, Kong LD, Wang YM, Cheng CH, Zhang WY, Tan WZ. Behavioral and biochemical studies on chronic mild stress models in rats treated with a Chinese traditional prescription Banxia-houpu decoction. *Life Sci.* 74:55-73, 2003.
- Li X, Taylor S, Zegarelli B, Shen S, O'Rourke J, Cone RE. The induction of splenic suppressor T cells through an immune-privileged site requires an intact sympathetic nervous system. *J Neuroimmunol.* 153:40-9, 2004.
- Lonne-Rahm S, Berg M, Marin P, Nordlind K. Atopic dermatitis, stinging, and effects of chronic stress: a pathocausal study. *J Am Acad Dermatol.* 51:899-905, 2004.
- Lopez JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ. A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin<sub>1A</sub>, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry* 43:547-73, 1998.
- Lowry CA. Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol.* 14:911-23, 2002.
- Ma S, Morilak DA. Norepinephrine release in medial amygdala facilitates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to acute immobilisation stress. *J Neuroendocrinol.* 17:22-8, 2005.
- MacQueen GM, Campbell S, McEwen BS, Macdonald K, Amano S, Joffe RT, y col. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:1387-92, 2003.
- Madden KS, Stevens SY, Felten DL, Bellinger DL. Alterations in T lymphocyte activity following chemical sympathectomy in young and old Fischer 344 rats. *J Neuroimmunol.* 103:131-45, 2001.
- Maes M, Scharpe S, Meltzer HY, Okayli G, Bosmans E, D'Hondt PB. y col. Increased neopterin and interferon-gamma secretion and lower availability of L-tryptophan in major depression: Further evidence for an immune response. *Psychiatry Res.* 54: 143-160, 1994.
- Maes, M. Evidence for an immune response in major depression: A review and hypothesis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.* 19:11-38, 1995.
- Magarinos AM, Deslandes A, McEwen BS. Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur J Pharmacol.* 371:113-22, 1999.
- Malik UR, Makower DF, Wadler S. Interferon-mediated fatigue. *Cancer.* 92:1664-8, 2001.

- Maltsev VA, Wolff B, Hess J and Werner G. Calcium signaling in individual T-cells measured by confocal microscopy, *Immunol Lett* 42:41-47, 1994.
- Mann JJ. The medical management of depression. *N Engl J Med.* 353:1819-34, 2005.
- Marchetti, B, Morale MC, Testa N, Tirolo C, Caniglia S, Amor S, y col., Stress, the immune system and vulnerability to degenerative disorders of the central nervous system in transgenic mice expressing glucocorticoid receptor antisense RNA. *Brain Res. Rev.* 37:259–272, 2001.
- Marques-Deak A, Cizza G, Sternberg E. Brain-immune interactions and disease susceptibility. *Mol Psychiatry.* 10:239-50, 2005. Erratum in: *Mol Psychiatry.* 10:972, 2005.
- Marsland AL, Bachen EA, Cohen S, Rabin B, Manuck SB. Stress, immune reactivity and susceptibility to infectious disease. *Physiol Behav.* 77:711-6, 2002.
- Matussek N. Opioid system in depression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 6:443, 2003.
- McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med.* 338:171-9, 1998.
- McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 22:105-22, 1999.
- McEwen BS. From molecules to mind. Stress, individual differences, and the social environment. *Ann N Y Acad Sci.* 935:42-9, 2001.
- McEwen BS. Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 933:265-77, 2001.
- McEwen BS. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism.* 54:20-3, 2005.
- McKittrick CR, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR. Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress. *Biol Psychiatry* 37:383-93, 1995.
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1:135.1, 2001.
- Meinkoth JL, Alberts AS, Went W, Fantozzi D, Taylor SS, Hagiwara M, y col.,. Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biochem.* 127-128:179-86, 1993.
- Mello Ade A, Mello MF, Carpenter LL, Price LH. Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Rev Bras Psiquiatr.* 25:231-8, 2003.
- Melmon KL, Bourne HR, Weinstein Y, Shearer GM, Kram J, Bauminger S. Hemolytic plaque formation by leukocytes in vitro. Control by vasoactive hormones. *J Clin Invest.* 53:13-21, 1974.
- Mendlovic S, Mozes E, Eilat E, Doron A, Lereya J, Zakuth V and Spierer Z. Immune activation in non-treated suicidal major depression. *Immunol. Lett.* 67, 105-108, 1999.
- Milad MA, Ludwig EA, Anne S, Middleton E Jr, Jusko WJ. Pharmacodynamic model for joint exogenous and endogenous corticosteroid suppression of lymphocyte trafficking. *J Pharmacokinet Biopharm.* 22:469-80, 1994.
- Miller AH. Neuroendocrine and immune system interactions in stress and depression. *Psychiatr Clin North Am.* 21:443-63, 1998.

- Miller AH, Pariante CM and Pierce BD. Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function: Glucocorticoid resistance and relevance to depression. In: Dantzer R, Wollman E and Yirmiya R, Editors. Cytokines, stress, and depression, Plenum/Kluwer Academic Publishers, New York, pp. 107-116, 1999.
- Miller DB and O'Callaghan JP. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism*. 51:5-10, 2002.
- Miller DB and O'Callaghan JP. Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Res Rev.*, 4:123-40, 2005.
- Mills PJ, Ziegler MG, Patterson T, Dimsdale JE, Hauger R. y col. Plasma catecholamine and lymphocyte  $\beta$ 2-adrenergic receptor alterations in elderly Alzheimer caregivers under stress. *Psychosom Med*. 59:251-6, 1997.
- Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui H and Tabira T. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback in rats. *Psychoneuroendocrinology* 26, 443-59, 2001.
- Monleon S, D'Aquila P, Parra A, Simon VM, Brain PF, Willner P. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology*, 117:453-7, 1995.
- Moynihan, JA, Karp JD, Cohen N, Cocke R. Alterations in interleukin-4 and antibody production following pheromone exposure: role of glucocorticoids. *J. Neuroimmunol*. 54: 51– 58, 1994.
- Muller, M. Holsboer F, Keck ME. Genetic modification of corticosteroid receptor signalling: novel insights into pathophysiology and treatment strategies of human affective disorders. *Neuropeptides* 36:117–131, 2002.
- Murray SE, Lallman HR, Heard AD, Rittenberg MB, Stenzel-Poore MP. A genetic model of stress displays decreased lymphocytes and impaired antibody responses without altered susceptibility to *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 167, 691-698, 2001.
- Musselman DL., Lawson,DH, Gumnick, JF, Manatunga AK, Penna S, Goodkin RS y col.. Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon . *N. Engl. J. Med*. 344: 961-966, 2001.
- Naliboff BD, Benton D, Solomon GF, Morley JE, Fahey JL, et al. Immunological changes in young and old adults during brief laboratory stress. *Psychosom Med*. 53:121-31, 1991.
- Nel AE. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J Allergy Clin Immunol*. 109:758-70, 2002. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol* 110:25, 2002.
- Newton AC, Johnson JE. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim Biophys Acta*. 1376: 155-172, 1998.
- Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*. 55:603-13, 2000.
- Niir H. and Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol*. 2:945-56, 2002.

- Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol.* 24:444-8, 2003.
- Papp M, Klimek V, Willner P. Effects of imipramine on serotonergic and beta-adrenergic receptor binding in a realistic animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 114:309–14, 1994.
- Pariante CM. Depression, stress and the adrenal axis. *J Neuroendocrinol.* 15:811-812, 2003.
- Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Cullinan WE, Hillard CJ. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology.* 145:5431-8, 2004.
- Pauli S, Linthorst AC, Reul JM. Tumour necrosis factor-alpha and interleukin-2 differentially affect hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioural activity, body temperature and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. *Eur J Neurosci.* 10:868-78, 1998.
- Peng SL. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 17:230-6, 2005.
- Pignatelli D, Maia M, Castro R, da Coceicao Magalhaes M, Vivier J, Defaye G. Chronic stress effects on the rat adrenal cortex. *Endocr. Res.* 26, 537–544, 2000.
- Plata-Salaman C.R. Cytokines and anorexia: A brief overview. *Semin. Oncol.* 25 Suppl. 1:64-72., 1998.
- Pollmacher T, Schuld A, Kraus T, Haack M, Hinze-Selch D. and Mullington J. Experimental immunomodulation, sleep, and sleepiness in humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917:488-499, 2000.
- Porter RJ, Gallagher P, Thompson JM, Young A.. Neurocognitive impairment in drug-free patients with major depressive disorder. *Br. J. Psychiatry* 182: 214-220, 2003.
- Procyk KJ, Rippon MR, Testi R, Hofmann F, Parker PJ, Baccarini M. Lipopolysaccharide induces jun N-terminal kinase activation in macrophages by a novel Cdc42/Rac-independent pathway involving sequential activation of protein kinase C zeta and phosphatidylcholine-dependent phospholipase C. *Blood.* 96:2592-8, 2000.
- Raida M, Kliche KO, Schwabe W, Hausler P, Clement JH, Behnke D, Hoffken K. Circadian variation of dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression in leukocytes and serum cortisol levels in patients with advanced gastrointestinal carcinomas compared to healthy controls. *J Cancer Res Clin Oncol.* 128:96-102, 2002.
- Ramer-Quinn DS, Baker RA, Sanders VM. Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. *J Immunol.* 159:4857-67, 1997.
- Ray O. The revolutionary health science of psychoendoneuroimmunology: a new paradigm for understanding health and treating illness. *Ann N Y Acad Sci.* 1032:35-51, 2004.
- Razi K, Greene KP, Sakuma M, Ge S, Kushner M, DeLisi LE. Reduction of the parahippocampal gyrus and the hippocampus in patients with chronic schizophrenia. *Br J Psychiatry;* 174:512-9, 1999.
- Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol.* 5:617-25, 2004.

- Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. *Mol Cell Biol.* 17:3181-93, 1997.
- Roitt IM, Delves PJ. *Roitt's Essential Immunology*, Royal Free & University College Medical School, Blackwell Publishing, 2002.
- Roszman TL, Brooks WH. Interactive signaling pathways of the neuroendocrine-immune network. *Chem Immunol.* 69:203-22, 1997.
- Rozlog LA, Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT, Sheridan JF, Glaser R. Stress and immunity: implications for viral disease and wound healing. *J Periodontol.* 70:786-92, 1999.
- Sacedon R, Vicente A, Varas A, Jimenez E, Munoz JJ, Zapata AG. Role of glucocorticoids in early T-cell differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 917:732-40, 2000.
- Sadek N and Nemeroff C, "Update on the Neurobiology of Depresión"<http://www.medscape.com/Medscape/Psychiatry/Treatment Update/2000>.
- Sanders VM, Baker RA, Ramer-Quinn DS, Kasprovicz DJ, Fuchs BA, Street NE. Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. *J Immunol.* 158:4200-10, 1997.
- Saphier D, Kidron D, Ovadia H, Trainin N, Pecht M, Burstein Y, Abramsky O. Neurophysiological changes in the brain following central administration of immunomodulatory factors. *Isr J Med Sci.* 24:261-3, 1988.
- Saphier D. Neurophysiological and endocrine consequences of immune activity *Psychoneuroendocrinology* 14:63-87, 1989.
- Sapolsky RM. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol. Psychiatry*;48:755-65, 2000.
- Schreiber E., Matthias P, Müller M, and Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts" prepared from a small number of cells. *Nucl. Acids. Res.*; 17:6419, 1989.
- Schwarz MJ, Chiang S, Muller N, Ackenheil M. T-helper-1 and T-helper-2 responses in psychiatric disorders. *Brain Behav Immun.* 15:340-70, 2001.
- Scott LV, Dinan TG. Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci.* 62:1985-98, 1998.
- Sen J, Venkataraman L, Shinkai Y, Pierce JW, Alt FW, Burakoff SJ, y col. Expression and induction of nuclear factor-kappa B-related proteins in thymocytes. *J. Immunol.*154: 3213-3221, 1995.
- Sheline YI, Mittler BL, Mintun MA. The hippocampus and depression. *Eur Psychiatry.* 17 Suppl 3:300-5, 2002.
- Sheridan JF. Stress-induced modulation of anti-viral immunity. *Brain Behav Immun*; 12:1-6, 1998.
- Shimizu N, Oomura Y, Kai Y. Stress-induced anorexia in rats mediated by serotonergic mechanisms in the hypothalamus. *Physiol. Behav.* 46, 835– 841, 1989.

- Silverman MN, Pearce BD, Biron CA, Miller AH. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol.* 18:41-78, 2005.
- Skalhegg BS, Johansen AK, Levy FO, Andersson KB, Aandahl EM, Blomhoff HK, y col. Isozymes of cyclic AMP-dependent protein kinases (PKA) in human lymphoid cell lines: levels of endogenous cAMP influence levels of PKA subunits and growth in lymphoid cell lines. *Cell Physiol.* 177: 85-93, 1998.
- Smith RS. The macrophage theory of depression. *Med. Hypoth.* 35:298-306, 1991.
- Smith RS and Maes M. The macrophage-T-lymphocyte theory of schizophrenia: Additional evidence. *Med. Hypotheses* 45, 135–141, 1995.
- Spitaler M, Cantrell DA. Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol.* 5:785-90, 2004.
- Stark JL, Avitsur R, Padgett DA, Campbell KA, Beck FM, Sheridan JF. Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 280, R1799–R1805, 2001.
- Steffenach H, Sloviter RS, Moser EI and Moser MB, Impaired retention of spatial memory after transection of longitudinally oriented axons of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:3194-8, 2002.
- Stenzel-Poore M, Vale WW, Rivier C. Relationship between antigen-induced immune stimulation and activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Endocrinology.* 132:1313-8, 1993.
- Straub RH, Westermann J, Scholmerich J, Falk W. Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. *Immunol Today.* 19:409-13, 1998.
- Strosberg AD. Structure and function of the beta 3 adrenoceptor. *Adv Pharmacol.* 42:511-3, 1998.
- Suarez A, Mozo L, Gayo A, Zamorano J, Gutierrez C. Requirement of a second signal via protein kinase C or protein kinase A for maximal expression of CD40 ligand. Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Eur J Immunol.* 27:2822-9, 1997.
- Sun Z, Arendt, CW, Ellmeier W, Schaeffer EM, Sunshine MJ, Gandhi L y col. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404: 402-407, 2000.
- Swaaba D., Ai-Min Baoa, B and Lucassenc P. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration, *Ageing Res Rev.*; 4:141-94, 2005.
- Swanson MA, Lee WT, Sanders VM. IFN-gamma production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to norepinephrine. *J Immunol.* 166:232-40. Erratum in: *J Immunol* 166:6992, 2001.
- Szamel M, Appel A., Schwinzer R and Resch KJ. Different protein kinase C isoenzymes regulate IL-2 receptor expression or IL-2 synthesis in human lymphocytes stimulated via the TCR. *Immunol.* 160: 2207-2214, 1998.

- Tamir A, Granot Y and Isakov N. Inhibition of T lymphocyte activation by cAMP is associated with down-regulation of two parallel mitogen-activated protein kinase pathways, the extracellular signal-related kinase and c-Jun N-terminal kinase. *J. Immunol.* 157: 1514–1522, 1996.
- Terao K, Suzuki J, Ohkura S. Circadian rhythm in circulating CD16-positive natural killer (NK) cells in macaque monkeys, implication of plasma cortisol levels. *Primates.* 43:329-38, 2002.
- Tichomirowa MA, Keck ME, Schneider HJ, Paez-Pereda M, Renner U, Holsboer F, Stalla GK. Endocrine disturbances in depression. *J Endocrinol Invest.* 28:89-99, 2005.
- Tichomirowa MA, Keck ME, Schneider HJ, Paez-Pereda M, Renner U, Holsboer F y col. Effects of chronic restraint stress on feeding behavior and on monoamine levels in different brain structures in rats. *Neurochem Res.* 27:519–25. 65, 2002.
- Torres IL, Gamaro GD, Vasconcellos AP, Silveira R, Dalmaz C. Effects of chronic restraint stress on feeding behavior and on monoamine levels in different brain structures in rats. *Neurochem Res.* 27:519-25, 2002.
- Tournier, JN, Mathieu J, Mailfert Y, Multon E, Drouet C, Jouan A, Drouet E. Chronic restraint stress induces severe disruption of the T-cell specific response to tetanus toxin vaccine. *Immunology.* 102:87-93, 2001. Erratum in: *Immunology* 102:515, 2001.
- Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 3:133-46, 2003.
- Trushin SA, Pennington KN, Carmona EM, Asin S, Savoy DN, Billadeau DD, Paya CV. Protein kinase Calpha (PKCalpha) acts upstream of PKCtheta to activate I kappaB kinase and NF-kappaB in T lymphocytes. *Mol.Cell. Biol.* 23: 7068-7081, 2003.
- Tuchinda M, Newcomb RW, DeVald BI. Effect of prednisone treatment on the human immune response to keyhole limpet hemocyanin. *Int. Arch. Allergy* 42: 533–544, 1972.
- Vega JL, Ganea D, Jonakait GM. Acute down-regulation of antibody production following spinal cord injury: role of systemic catecholamines. *J Neuropathol Exp Neurol.* 62:848-54, 2003.
- Villasenor-Garcia MM, Lozoya X, Puebla-Perez AM. An experimental model of stress-induced immunosuppression produced by electrical stimulation of the brain in the rat. *J Neuroimmunol.*;114:35-9, 2001.
- Wang J and Dunn AJ. Mouse interleukin-6 stimulates the HPA axis and increases brain tryptophan and serotonin metabolism. *Neurochem. Int.* 33, 143–154, 1998.
- Wang J and Dunn AJ. The role of interleukin-6 in the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis and brain indoleamines by endotoxin and interleukin-1 beta. *Brain Res.* 815, 337–348, 1999.
- Webster J, Tonelli L. and Sternberg E. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 20:125-63, 2002.
- Weiss G, Murr C, Zoller H, Haun M, Widner B, Ludescher C, Fuchs D. Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells. *Clin Exp Immunol.* 116:435-40, 1999.

- Wermerskirchen AS, LaTocha DH, Clarke BL. Adrenocorticotrophic hormone controls Concanavalin A activation of rat lymphocytes by modulating IL-2 production. *Life Sci.* 67:2177-87, 2000.
- Whiteside TL and Herberman RB. Role of human natural killer cells in health and disease *Clini Diagn Lab Immuol* 1994; 1:125-133, 1994.
- Wilckens T and De Rijk R. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol. Today* 18: 418– 424, 1997.
- Willner P, Muscat R, Papp M.. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci. Biobehav. R.* 16, 525-534, 1992.
- Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology* 134:319-29, 1997a
- Willner, P. The chronic mild stress procedure as an animal model of depression: valid, reasonably reliable, and useful. *Psychopharmacology* 134, 371-377, 1997b.
- Wisniewska M, Pyrzynska B, Kaminska B. Impaired AP-1 dimers and NFAT complex formation in immature thymocytes during in vivo glucocorticoid-induced apoptosis. *Cell Biol Int.* 28:773-80, 2004.
- Wong ML, Kling MA, Munson PJ, Listwak S, Licinio J, Prolo P, y col. Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: relation to hypercortisolism and corticotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97:325-30, 2000.
- Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M and Goeddel DV IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 278: 866-869, 1997.
- Wrona D, Klejbor I, Trojnar W. Chronic electric stimulation of the midbrain ventral tegmental area increases spleen but not blood natural killer cell cytotoxicity in rats. *J Neuroimmunol.* 155:85-93, 2004.
- Wrona D, Trojnar W. Suppression of natural killer cell cytotoxicity following chronic electrical stimulation of the ventromedial hypothalamic nucleus in rats. *J Neuroimmunol.* 163:40-52, 2005.
- Yasuda I, Kishimoto A., Tanaka S, Tominaga M, Sakurai A and Nishizuka Y. A synthetic peptide substrate for selective assay of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166:1220-1227, 1990.
- Zalcman S, Savina I and Wise RA. Interleukin-6 increases sensitivity to the locomotor-stimulating effects of amphetamine in rats. *Brain Res.* 847:276-283, 1999.
- Zenker S, Haverkamp F, Klingmuller D. Growth hormone deficiency in pituitary disease: relationship to depression, apathy and somatic complaints. *Eur J Endocrinol.* 147:165-71, 2002.
- Zhao H, Wu GC, Cao XD. Immunomodulatory activity of orphanin FQ/nociceptin on traumatic rats. *Acta Pharmacol Sin.* 23:343-8, 2002.