

11281  
2ej  
3  
1987  
MAY 10 1987

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**NEUROBIOLOGIA DEL INTERCEREBRO**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE :

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
AREA FISILOGIA.**

PRESENTA:

M. EN C. CRUZ REYES VAZQUEZ.

ASESOR : DR. HECTOR BRUST CARMONA.

VERANO DE 1987.

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RESUMEN

Debido a sus propiedades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras, el interferon es empleado clínicamente para tratar diversas patologías virales, desórdenes inmunológicos y cáncer. Una de las consecuencias más comunes derivadas del uso del interferon- $\alpha$  en humanos, es el desarrollo de una serie de efectos "colaterales"; tales como fiebre, anorexia, parestesias de pies y manos, mialgias, dolor de cabeza, fatiga y confusión mental. Tales efectos indeseables sugieren una acción del interferon- $\alpha$  sobre estructuras nerviosas cerebrales. Por otro lado, tanto estudios bioquímicos como inmunológicos, muestran que existe una relación estructural y fisiológica entre el interferon- $\alpha$  y algunas moléculas derivadas de la  $\beta$ -lipoproteína, tales como la  $\alpha$ -corticotrofina, la  $\gamma$ -endorfina y la  $\alpha$ -hormona estimulante de los melanocitos. Entonces, el interferon- $\alpha$  es capaz de bloquear la unión estereo-específica a la morfina y de causar una analgesia e inmovilidad bloqueable por la naloxona. Estos datos sugieren una interacción entre el interferon- $\alpha$  y los receptores opioides. Los trabajos aquí presentados tienen por objeto el describir un posible efecto cerebral del interferon y encontrar su mecanismo de acción. Se realizaron tanto estudios electrofisiológicos como conductuales. Se obtuvieron registros electroencefalográficos en 12 estructuras cerebrales en ratas, después de la administración intraperitoneal de interferon- $\alpha$ . También se realizó la aplicación microiontoforética del interferon- $\alpha$  en 4 estructuras cerebrales; corteza somatosensorial, hipocampo dorsal, tálamo medial e hipotálamo ventromedial. Por microiontoforésis se aplicaron varios tipos de interferones sobre la corteza somatosensorial. Por otro lado, observamos los efectos del interferon- $\alpha$  sobre la actividad mieléctrica del intestino, como un índice de su efecto anorexígeno. Además, realizamos interacciones farmacológicas entre el interferon- $\alpha$ , la morfina y la naloxona, como un procedimiento encaminado a detectar cualquier relación entre el interferon- $\alpha$  y los receptores opioides. Estas interacciones farmacológicas las realizamos por microiontoforésis en la corteza somatosensorial y en preparaciones de ileo aislado de cobayo. En nuestros estudios conductuales, analizamos los efectos del interferon- $\alpha$  sobre la ingesta de alimentos y sobre el síndrome de carencia a los opioides. Nuestros resultados muestran que el interferon- $\alpha$ , pero no el  $\gamma$ , es capaz de modificar, con características farmacológicas propias, a la actividad nerviosa cerebral, tanto desde el punto de vista eléctrico como conductual. Aunque este interferon induce efectos opioides, su acción no se ejerce a través de los receptores típicos a los fármacos opioides. Aún desconocemos cual es el mecanismo que el interferon emplea para inducir tales efectos. En el trabajo se discute la relevancia fisiológica que estos resultados pueden poseer.

## ABSTRACT

Interferon, the body's most rapidly produced defense against viruses, has also antiproliferative and immunomodulatory properties. These properties are used clinically to treat several disorders, such as viral infections, cancer and immunologic alterations. Using interferons in humans have several consequences, the most prominent is the occurrence of several "side" effects, like fever, anorexia, numbness in hands and feet, myalgia, headache, fatigue and mental confusion. Such "undesirable" effects suggest an interferon action on central nervous system structures. In the other hand both, biochemical and immunologic studies have shown that interferon- $\alpha$  has an structural and physiologic relationship with some proteins derivated from the  $\beta$ -lipoprotein, mainly to  $\alpha$ -corticotropin,  $\gamma$ -endorphin and  $\alpha$ -stimulating melanocyte hormone. Then, interferon- $\alpha$  is able to reduce the specific dihydromorphine binding and induce a morphine-like analgesia and catatonia. These interferon's effects are prevented by naloxone suggesting a direct interaction between interferon and opiate receptors. Our objective in the present studies, consist in demonstrate a cerebral effect of interferon- $\alpha$ , and to find out which mechanism is used to provoke such effects. We made both, electrophysiologic and behavioral studies. Electroencephalographic studies were made from 12 cerebral structures in rats before and during the IP administration of interferon- $\alpha$ . Also we made the microiontophoretic application of interferon- $\alpha$  in the somatosensorial cortex, dorsal hippocampus, medial thalamus and ventromedial hypothalamus. By microiontophoresis we applied several kinds of interferons on the somatosensorial cortex. Additionally, we observed the effects of interferon- $\alpha$  on the myoelectric activity of the small intestine, as an index of its anorexic action. Several pharmacologic interactions were made using interferon- $\alpha$ , morphine and naloxone, as a procedure underwent to determine any relationship between the interferon- $\alpha$  and the opiate receptors. These pharmacologic interactions were made by microiontophoresis in cortex and in the classic guinea-pig longitudinal smooth muscle ileum preparation. In our behavioral studies we analyze the interferon- $\alpha$  effects on food intake and on opiate withdrawal syndrome. Our results show that Interferon- $\alpha$  but not interferon- $\gamma$ , is able to modify, in a pharmacologic pattern, the central nervous system activity, either in an electrophysiological or in a behavioral fashion. Although the interferon- $\alpha$  induce opiate-like effects, its action is not mediated by the classic opiate receptors. We still do not know the exact mechanism used by interferon in order to influence the nervous activity. In the text, the physiological relevance of these results are discussed.

## NEUROBIOLOGIA DEL INTERFERON

La primera descripción del interferon fue realizada en 1956 cuando Isaacs y Lindenmann (47) mostraron que las membranas corioalantoideas de embriones de pollo, expuestas al virus de la influenza inactivado por calor, producían un factor que protegía a tejidos frescos de una infección con virus de la influenza vivos. Estos autores llamaron a esta sustancia "interferon" debido a su capacidad para interferir con la infectividad viral.

Tiempo después se mostró que en realidad el interferon es toda una familia de proteínas relacionadas tanto estructural como fisiológicamente. Estas sustancias se caracterizan por la potencialidad que poseen para inhibir la replicación de un amplio espectro de virus, incluyendo tanto a aquellos que contienen ARN o ADN, como a los virus de cepas oncogénicas y no oncogénicas (51). Las cantidades séricas de interferon en ausencia de una infección viral son indetectables, estos niveles sin embargo se encuentran aumentados considerablemente, cuando se realiza la inoculación de agentes inductores, de los cuales los principales son virus, no obstante existe una gran variedad de sustancias inductoras no virales, como es el caso de algunas bacterias, sustancias mitogénicas, detritus celulares, etc. (51).

El interferon es distinto de otros agentes antivirales por el hecho, de solo actuar sobre la célula huésped, esta interacción induce un estado que le concede refractariedad a la replicación viral intracelular. La unión entre el interferon y la membrana de la célula es un prerequisite indispensable para adquirir esta

resistencia antiviral (32).

Recientemente estudios bioquímicos realizados con ligandos radiomarcados, mostraron evidencias concluyentes y definitivas de la existencia de receptores específicos al interferón. Estos receptores son saturables y de alta afinidad y se localizan en la membrana plasmática. La unión del interferón a estos receptores es la primera etapa de la expresión de su actividad antiviral y antiproliferativa (50).

Actualmente se han clasificado a todo este grupo de proteínas en 3 principales categorías de interferones: el interferón- $\alpha$  (cuyo origen es principalmente de leucocitos); el interferón- $\beta$  (proveniente de fibroblastos) y el interferón- $\gamma$  (el cual proviene de células de origen inmune). Estas categorías de interferones pueden ser distinguidas por sus propiedades antigénicas. Así como también, por la naturaleza de la sustancia inductora empleada y la fuente de que se derivan o les da origen.

Los interferones- $\alpha$ , por ejemplo, son una categoría que contiene al menos 14 especies altamente homólogas, es decir hay aproximadamente un 75 % de homología en la secuencia de sus aminoácidos. Estos interferones son producidos por toda una variedad de tipos celulares, incluyendo macrófagos, linfocitos innominados (linfocitos no catalogados como T o B) y líneas celulares de linfocitos tipo B. Estas células producen altas cantidades de interferones- $\alpha$  cuando son expuestas a virus vivos o inactivados, y a ácidos ribonucleicos de doble hélice o bien a productos bacterianos.

El interferón- $\beta$ , el cual es producido principalmente por fibroblastos y células epiteliales en respuesta a los mismos

inductores que estimulan la producción del interferon- $\alpha$ , consiste principalmente de una sola especie que comparte aproximadamente, una homología del 30 % en su secuencia de aminoácidos con el interferon- $\alpha$  (59). Un avance importante en el estudio de este tipo de interferon fue proporcionado por Segal y Cols., (86) quienes lograron descifrar a todo el gen que codifica al interferon- $\beta$  en humanos. Probablemente el interferon- $\alpha$  y el interferon- $\beta$  compiten por el mismo receptor de la superficie celular (15).

El interferon- $\gamma$  es el producto de un gen simple, este interferon se deriva de los linfocitos T y por células asesinas naturales que han sido estimuladas por antígenos específicos y por mitógenos no específicos. El interferon- $\gamma$  utiliza a un receptor distinto al de los otros interferones para inducir el estado antiviral. Es posible que los efectos intracelulares que provoca este interferon sean únicos y también diferentes a los provocados por otros interferones (53). El interferon- $\gamma$  posee solo una homología muy reducida en su secuencia de aminoácidos con los otros interferones (36).

Una vez que el interferon fué identificado como una sustancia antiviral, se mostró que las preparaciones de estas sustancias podían efectuar otras acciones biológicas, así Pauker (61) mostró que algunas preparaciones relativamente impuras de interferon- $\alpha$  múrido ejercen un efecto antiproliferativo sobre la reproducción de fibroblastos provenientes del ratón. Posteriormente algunos estudios mostraron que las preparaciones de interferon- $\alpha$  múrido podrían mostrar actividad antitumoral en ratones implantados con una gran variedad de líneas celulares tumorales (38) o en tumores inducidos

por sustancias químicas (81) así como también en tumores de origen viral (1).

En este sentido resultan sumamente interesantes los trabajos de Gresser y Cols., (37) quienes mostraron que una línea de células leucémicas, insensibles In Vitro a la actividad antiproliferativa del interferon, respondía en condiciones In Vivo. Estos datos sugieren que el interferon es también capaz de estimular el sistema inmune del huésped y que la actividad antitumoral puede resultar de una combinación de efectos ejercidos por el huésped y de la actividad antiproliferativa directa del interferon. Estos resultados propiciaron la búsqueda de las influencias que el interferon podría ejercer en el sistema inmune, y en otros sistemas, en el organismo.

Hasta la fecha se han descrito múltiples efectos, llamados "no antivirales" del interferon, descritos en una gran variedad de estructuras histológicas.

En lo relacionado al interferon- $\alpha$ , en 1980 en una excelente revisión de Taylor-Papadimitriou (95) se mencionan todas aquellas acciones o efectos del interferon- $\alpha$  sobre las funciones celulares, hasta entonces descritas. Este autor emplea un criterio funcional para agrupar las acciones del interferon- $\alpha$ . De acuerdo con este criterio, el interferon- $\alpha$  es capaz de inhibir funciones celulares tales como:

1. La división celular en:
  - a) Células L (renales tumorales).
  - b) Linfocitos.
  - c) Células hepáticas en regeneración.



- d) Células de la médula ósea.
  - e) Células epiteliales.
2. La tumorigenicidad.
  3. La formación de algunos tipos de anticuerpos tanto In Vivo como In Vitro.
  4. La reacción de hipersensibilidad retardada.
  5. La captación de timidina en células L1210 .
  6. La diferenciación inducida por dimetil sulfoxido en células F (embrionarias).
  7. La diferenciación inducida por insulina de células 3T3 hacia adipocitos.
  8. La producción de esteroides inducidos por glicerol-3-fosfato.
  9. La producción de esteroides inducidos por tirosina aminotransferasa en células de hepatoma.
  10. La actividad de la glutamino sintetasa en la retina de pollo.
  11. La actividad de la ornitina descarboxilasa de fibroblastos inducida por factores de crecimiento sérico y promotores tumorales.
  12. La liberación del activador del plasminógeno inducido por el suero.
  13. La diferenciación de los monocitos humanos hacia macrofagos.

Por otro lado, el interferon- $\alpha$  es capaz de incrementar:

1. La fagocitosis de los macrófagos.
2. La citotoxicidad de los linfocitos sensibilizados.

3. La actividad de las células asesinas naturales.
4. La producción de ciertos anticuerpos.
5. La expresión de antígenos de superficie.
6. La expresión de antígenos carcino-embriónicos.
7. La producción de interferon (imprimación).
8. La inducción de la hidroxilasa aril hidrocarbón.
9. La liberación de inmunoglobulina IgE de basófilos mediada por histamina.
10. La síntesis de la metilasa del ARN de transferencia.
11. La síntesis de prostaglandinas.
12. La síntesis de cetosteroides por parte de las células adrenales.
13. La citotoxicidad del ARN.
14. La frecuencia de latido de las células del miocardio.
15. La excitabilidad de neuronas de gato en cultivo.

Una simple observación de estas acciones del interferon- $\alpha$  descritas, muestran lo lejos que estas sustancias se han desplazado desde su punto de partida propuesto como simplemente agentes antivirales.

Muchos de estos efectos biológicos descritos fueron originalmente obtenidos con preparaciones de interferones humanos ó müridos relativamente impuros. Lo que puso en duda que algunas de estas acciones fueron en realidad una consecuencia de una acción mediada por el interferon- $\alpha$ . Algunos resultados contradictorios apoyaron tal sugerencia (96). No obstante, tiempo después, cuando fue posible clonar un simple gen para el interferon- $\alpha$  humano (91) y como consecuencia fue posible la obtención de grandes cantidades de la

proteína expresada por ese gen, fue posible establecer una demostración inequívoca de que tales efectos biológicos son una propiedad inherente al interferon- $\alpha$ .

El interferon proveniente de esta línea de ingeniería genética llamado interferón recombinante- $\alpha$  es la herramienta más poderosa con que se cuenta en la actualidad para analizar la biología y los mecanismos de acción del interferon. Este tipo de interferon posee muchas ventajas con respecto al interferon natural proveniente de cultivos de leucocitos. Además, la aplicación de esta tecnología del ADN recombinante, permite la construcción de algunas variantes nuevas y de interferones híbridos (92) los cuales han brindado muy importantes informes acerca de las bases estructurales de los efectos biológicos del interferon.

La utilidad clínica del interferon esta siendo cuestionada por múltiples estudios. Las propiedades más empleadas clínicamente del interferon- $\alpha$  son sus acciones antivirales y antiproliferativas. Los resultados de los estudios clínicos que intentan mostrar su efectividad en estos 2 campos son sin embargo no muy alentadores. Así, en infecciones virales la acción terapéutica del interferon puede ir desde muy buena en el caso del condiloma acuminata (40); buena como en algunos casos de hepatitis viral tipo B (48); regular como en el caso de las infecciones por virus del Herpes simple (63) hasta nula como en el caso de las infecciones por el virus de Epstein-Barr (21).

La actividad antiproliferativa del interferon- $\alpha$  también ha sido ampliamente estudiada en varios ensayos clínicos. Al igual que sus acciones antivirales, la acción terapéutica antineoplásica del

interferon- $\alpha$  es muy controversial. En general el interferon posee efectos terapéuticos notables sólo en algunos tipos de cáncer, tales como la leucemia de células pilosas (69), o en la papilomatosis laríngea juvenil (90) donde el porcentaje de remisión en estas neoplasias es casi del 100%. El interferon- $\alpha$  produce también efectos terapéuticos moderados en otros tipos de neoplasia como en el cáncer de mama (42) o en el osteosarcoma (64).

Una característica común que muestran todos los pacientes tratados con interferon es la presencia de otros efectos llamados "colaterales" e "indeseables", de índole reversible, y que se relacionan en forma directa con la dosis empleada. Muchos de estos efectos se relacionan con actividades coordinadas por el sistema nervioso central. Así la primer descripción de los efectos "tóxicos" del interferon- $\alpha$  fué realizada por Scott en 1981 (85), quién mostró que los efectos colaterales más frecuentemente reportados por los pacientes que reciben dosis altas de interferon- $\alpha$  fueron la anorexia y la fiebre de origen central. Estos signos se presentaron en el 100 % de la muestra de sujetos tratados con 150 U.I. por Kg de peso. Otros síntomas frecuentes, fueron, las mialgias, las parestesias de las manos y los pies, una disminución de la percepción sensorial, debilidad muscular, fatiga, dolor de cabeza, mareos, náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de peso, fotofobia y en menor grado confusión mental.

Posteriormente otros estudios clínicos mostraron la presencia de tales "efectos colaterales" tanto en sujetos voluntarios sanos que recibieron interferon- $\alpha$  (85) como en sujetos con cáncer tratados con este interferon (88). Estos efectos surgen tanto con el empleo de

preparaciones poco puras de interferon (65) como con la administración de soluciones de interferon- $\alpha$  recombinante con una pureza del 99 % (42).

Los efectos " tóxicos " o " colaterales " observados después de la administración de interferon- $\alpha$  podrían ser explicados por acciones periféricas de esta sustancia. Así, la anorexia y la fiebre pueden ser resultado de modificaciones en la fisiología hepática o gastrointestinal, y de la producción de sustancias pirógenas, respectivamente. De igual forma, las mialgias, parestesias de extremidades, la debilidad muscular, la fatiga, y demás síntomas pueden ser consecuencia de efectos periféricos del interferon- $\alpha$ . Sin embargo también existe la posibilidad de que tales acciones representen un efecto directo sobre el sistema nervioso central. Signos como la disminución de la percepción sensorial y la confusión mental que se presentan en pacientes tratados con interferon, sugieren que esta sustancia puede modificar la Fisiología del sistema nervioso central. Esta sugerencia implicaría que el interferon- $\alpha$  es capaz de alterar las características y propiedades de la membrana celular, a fin de modificar su excitabilidad. Esta implicación parece ser cierta. Así en 1979; Calvet y Gresser (17) mostraron que la adición de interferon- $\alpha$  a cultivos de neuronas provenientes de gatos recién nacidos, provocaba un incremento en varios parámetros de la excitabilidad neuronal. Primero, estos autores notaron un incremento de la frecuencia de descarga espontánea de estas células. Después, encontraron una disminución de la reobase y como consecuencia del umbral de estas neuronas para estímulos que provocaban respuestas propagables. Finalmente empleando una técnica

de potenciales provocados notaron que al añadir el interferon- $\alpha$  se producía un decremento de la latencia de tales señales eléctricas lo que sugiere un aumento en la velocidad de conducción.

Estos efectos pueden ser el resultado de alguno o varias de las acciones que el interferón- $\alpha$  ejerce a nivel de la membrana celular y que fueron descritos desde una década antes. Estas acciones son resumidas por Taylor-Papadimitriou (95) y pueden ser enlistadas como:

1. Incremento en la expresión de antígenos de superficie.
2. Incremento de la carga negativa neta de la membrana.
3. Incremento de las partículas intramembranasas.
4. Incremento de la unión de lecitinas a la membrana.
5. Cambios en el transporte de iones en las vesículas de la membrana.
6. Cambios en la captación de timidina por parte de la membrana celular.
7. Inhibición de la unión de la toxina del colera y de la hormona estimulante de la tiroides.
8. Inhibición de la formación de componentes de superficie de los linfocitos.
9. Disminución de la exposición de moléculas de oligosacáridos a algunos gangliósidos.
10. Estimulación de la actividad de la adenilciclasa.
11. Efectos sobre la liberación de partículas en células de ratón infectadas con un virus inductor de leucemia.
12. Efectos sobre la incorporación de glucoproteínas y proteínas de la membrana dentro del virus de la estomatitis

vesicular.

Es importante mencionar que todos estos estudios fueron realizados In Vitro por lo que su ocurrencia y significado fisiológico In Vivo son aún materia de discusión actual. Sin embargo, algunos de estos efectos pueden explicar una alteración de las propiedades eléctricas de grupos celulares como las neuronas. Esto podría inducir cambios en la excitabilidad celular y finalmente ser fuente de origen de los efectos tóxicos neurológicos descritos en los estudios clínicos que emplean interferon- $\alpha$ .

Otra implicación, resultado de la sugerencia de un efecto neurológico del interferon- $\alpha$  en pacientes tratados con esta sustancia, se relaciona con la biodisponibilidad del interferon- $\alpha$ . Esto es, la administración de interferon- $\alpha$  en estos pacientes se ha realizado por vía intramuscular y subcutánea; por lo que tratándose de una sustancia protéica de alto peso molecular (entre 15 000 y 23 000 daltons) su paso a través de la barrera hemato-encefálica resulta dudoso. De hecho los primeros estudios sobre la farmacocinética del interferon- $\alpha$  mostraron que éste no cruza la barrera hemato-encefálica (46) ó lo hace en una proporción de sólo el 1 % de la dosis administrada (11). Sin embargo, otros estudios parecen indicar que la proporción del interferon que atravieza esta barrera después de su administración intravenosa, puede ser mayor (43).

Bajo estas circunstancias resultó necesario contar con un modelo animal que nos permitiera mostrar que la administración de interferon- $\alpha$  puede inducir efectos neurológicos. Esto revestía varios problemas. El principal de ellos, es de índole evolutivo, esto es, que aunque el interferon no es específico contra algún tipo de virus

(51), éste sí es específico de especie (6). Cuando menos en lo relacionado con su acción antiviral, el interferon- $\alpha$  humano no tiene ningún efecto en algún otro tipo de especie, lo mismo sucede con el interferon- $\alpha$  murino el cual solo ejerce efectos antivirales en células de ratón.

Otro problema que se originaría como resultado de emplear un modelo animal, consiste en efectuar una transposición entre los resultados obtenidos en este modelo animal y los efectos observados en humanos. Evidentemente, a fin de que tal transposición sea lo menos errónea posible es necesario encontrar parámetros lo más objetivos posibles que permitan establecer un paralelismo entre ambos tipos de respuestas.

El primer enfoque experimental que decidimos realizar fue determinar un posible efecto de una dosis única de interferon- $\alpha$  (150 U.I./g de peso) ya sea murino o humano, sobre 2 de los parámetros más gruesos de la actividad nerviosa cerebral, la observación de la conducta locomotriz y la actividad electroencefalográfica. Decidimos registrar 12 estructuras cerebrales, tanto corticales como subcorticales, con la idea de establecer una localización dinámica y regional de algún posible efecto inducido por el interferon- $\alpha$ .

En este experimento utilizamos ratas macho Sprague-Dawley (180-230 g), a las cuales les implantamos, en una sesión quirúrgica y bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/kg) electrodos monopolares de acero inoxidable (80  $\mu$ m) en las siguientes estructuras: En ambas cortezas somatosensoriales; en la formación reticular mesencefálica de ambos lados; en las dos cortezas motoras. En ambos núcleos caudados; un electrodo en el hipotálamo



ventromedial; uno en el núcleo parafascicular y finalmente uno en el hipocampo dorsal. El electrodo de referencia se colocó en uno de los senos frontales. Estos 12 electrodos se montaban sobre un conector, el cual a su vez se fijaba al cráneo empleando acrílico dental.

Después de 4 a 7 días del procedimiento quirúrgico, los animales se colocaron en una caja de plexiglass colocada dentro de una cámara de registro aislada eléctricamente y a prueba de ruido. Los electrodos de registro se conectaron a sondas de baja impedancia cuya entrada se localizaba en un preamplificador Grass P 511 (con filtros de bajas frecuencias en 0.3 Hz y de altas frecuencias colocado en 1 KHz). Se utilizó un conmutador de 12 canales, el cual estaba montado sobre un brazo de contrabalanceo. Este conmutador permitía una conexión constante entre los electrodos y el equipo de registro independientemente de la actividad locomotora del animal.

La actividad electroencefalográfica fue registrada en un polígrafo Grass 7D de 12 canales, un sistema de circuito cerrado de televisión fue empleado para analizar la conducta motora del sujeto. La sesión experimental se iniciaba colocando al sujeto dentro de la cámara de registro durante 1 a 2 horas antes de iniciarse éste, con la finalidad de habituarse al ambiente externo. La actividad electroencefalográfica fue registrada durante 330 minutos. Los primeros 30 minutos comprendían al registro basal, y los 300 minutos restantes, al registro realizado posterior a la administración intraperitoneal de 150 U.I./g de peso de interferon- $\alpha$ , ya sea humano ó murino. Veinticuatro horas después un nuevo registro por 30 minutos fue obtenido de estos mismos animales. Durante todo el tiempo de registro se observó la conducta de cada animal. Un grupo de

sujetos recibió como único tratamiento la administración intraperitoneal de 0.5 ml de una solución de albúmina al 10 %. Esta solución constituía el vehículo en el cual se disolvía el interferón.

La interpretación del electroencefalograma de estas ratas fue hecha sobre la base de la frecuencia de las ondas observadas. Se determinaba la actividad sincrónica versus la actividad asincrónica entre los diferentes sitios. Con este método se hace una evaluación de la energía eléctrica cerebral (70). La actividad electroencefalográfica, posee una frecuencia dominante la cual es relativamente estable. Muchas frecuencias más lentas o más rápidas, pueden ser sobrepuestas sobre la dominante, pero en términos generales ésta frecuencia dominante es la más útil cuando se realiza una interpretación visual de los registros (71).

Los registros de este trabajo fueron interpretados tanto visualmente como por un espectro de frecuencias realizado gracias a una microcomputadora DEC 11/03. Este análisis automatizado, nos permitía determinar el porcentaje de tiempo, en un intervalo determinado, en el que una frecuencia se manifestaba en el electroencefalograma. De esta manera se realizaba el análisis de frecuencias mientras que el análisis de voltaje se realizaba visualmente. Las frecuencias promedio fueron calculadas de muestras de registro tomadas en momentos cuando el animal no se movía.

Una vez finalizado el registro, los animales recibían una sobredosis de pentobarbital sódico. Una corriente anódica de 5 mA <sup>aplicada</sup> fue administrada durante 8-10 segundos a través de cada uno de los electrodos. Posteriormente los animales fueron perfundidos con una

solución de formaldehído al 10 % y de ferrocianuro de potasio al 3 %, intentando producir una mancha azul en el sitio de la lesión. Los cerebros fueron extraídos y posteriormente cortados en un microtomo de congelación en rebanadas de 80  $\mu\text{m}$ . Después de la tinción con hematoxilina y eosina, se verificó en estos cortes histológicos los sitios donde se realizaron los registros.

Los resultados obtenidos de estos experimentos (22), mostraron que la aplicación de una sola dosis de interferon- $\alpha$  intraperitoneal modifica la actividad eléctrica cerebral manifestada a través del electroencefalograma.

La actividad eléctrica dominante durante el periodo control consistió en el 90 % de los sujetos ( $n=14$ ), de una frecuencia promedio de 6 a 8 ciclos (ritmo  $\alpha$ ) por segundo, dependiendo de la estructura (Fig.1).

Tanto el análisis visual como el computarizado mostró que, en el total de los animales, la administración de cualquiera de los 2 tipos de interferon- $\alpha$  empleados provocó un incremento solo en la amplitud del ritmo dominante sin modificar en forma significativa su frecuencia. Este efecto se manifestó por la presencia de ondas agudas o picudas de alto voltaje (Fig.1). Los cambios en la amplitud mostraron una frecuencia de aparición irregular y aparecían aparecer en una estructura y no en otras, es decir no mostraban sincronización entre las diversas estructuras registradas. Aunque, también podían aparecer en forma simultánea entre las diferentes estructuras. En el 80% de los animales registrados; la primera estructura que mostró estos cambios después de la administración del interferon- $\alpha$  fue el hipotálamo ventromedial. la latencia de aparición de este efecto fue

de  $4.7 \pm 2.2$  min. posteriormente la corteza somatosensorial y el hipocampo dorsal mostraban tales cambios. En el 20 % restante de los animales fue la corteza somatosensorial la que mostró la latencia más corta.

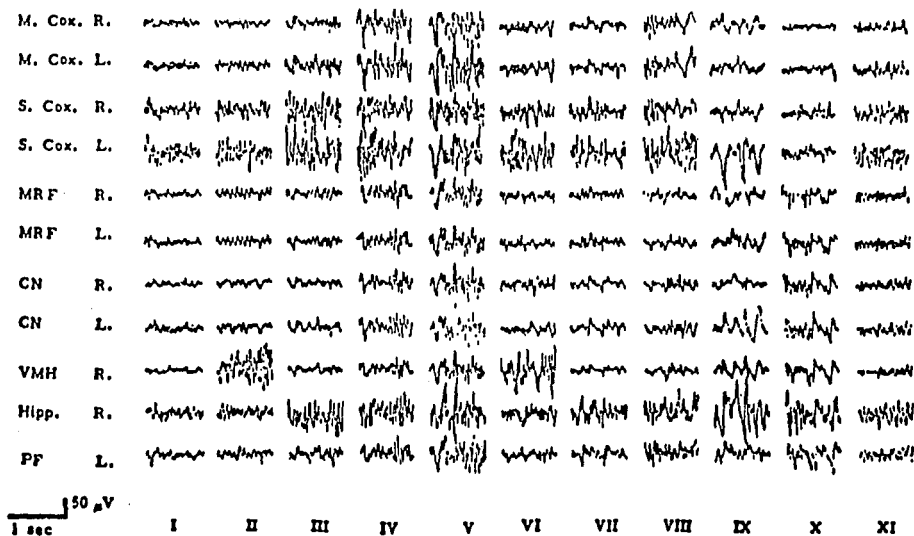


Fig. 1.- Trazos seleccionados del electroencefalograma de una rata, la cual recibió una dosis intraperitoneal de 150 U.I./g de peso corporal de interferon- $\alpha$ . Estos trazos corresponden a registros realizados en : la corteza motora (M. Cor.); la corteza somatosensorial (S. Cox); la formación reticular mesencefálica (MRF); el núcleo caudado (NC); el hipotálamo ventromedial (VMH); el hipocampo dorsal (Hipp) y el núcleo parafascicular (PF). R y L, representan el lado derecho e izquierdo respectivamente. Estos registros fueron realizados antes (I) y después de 5 (II), 12 (III), 15 (IV), 30 (V), 60 (VI), 120 (VII), 180 (VIII), 240 (IX) y 300 (X) minutos de realizada la administración del interferon- $\alpha$ . Los registros en XI se realizaron 24 horas después (tomada de 22).

Después de 15 min todas las estructuras restantes podrían mostrar estos incrementos de voltaje, en forma simultánea ó en forma alterna. En 2 sujetos tal efecto se mostró en una forma sincronizada en todas las estructuras durante las 6 horas de registro post-interferon- $\alpha$ . Sin embargo, cuando los registros se realizaron después de 24 horas, todos los sujetos mostraron un patrón electroencefalográfico similar al observado durante el registro control (Fig.1).

Desde un punto de vista conductual, la única diferencia entre los animales controles y los animales tratados con interferon- $\alpha$  fué un pequeño temblor distal de las extremidades posteriores, el cual se manifestaba cuando el animal permanecía echado y desaparecía cuando el sujeto realizaba desplazamientos o se paraba en sus extremidades posteriores. Tal efecto sólo se observó en 9 de los animales probados.

Los resultados encontrados en este trabajo permiten establecer varias consideraciones relacionadas con la farmacología del interferon- $\alpha$ . Quizá la más importante es la evidencia que muestra un efecto cerebral del interferon- $\alpha$ . Cabe mencionar que la cantidad, administrada (150 U.I.) corresponde a la dosis más alta frecuentemente empleada en clínica (42) y que como consecuencia produce los efectos colaterales más intensos, lo que indica que los efectos encontrados son de índole farmacológico y no es posible entonces discernir si el interferon- $\alpha$  afecta al sistema nervioso central en condiciones fisiológicas.

Al obtener estos resultados en la rata con el empleo de 2 interferones- $\alpha$  de origen diferente (humano y murino) se sugiere que

estos efectos no son específicos de especie; a diferencia de su actividad antiviral o antineoplásica. Por lo que los mecanismos que median estos efectos deben ser diferentes.

Otra de las consideraciones importantes de este trabajo, es lo relacionado a la latencia del efecto. El interferon- $\alpha$  es una proteína de alto peso molecular cuyo paso a través de la barrera hematoencefálica es dudosa (88) o existe en muy poca cantidad (11). De tal manera que el obtener una latencia de  $4.7 \pm 2.2$  min. implica 2 posibilidades; por un lado el efecto observado es indirecto, es decir el interferon- $\alpha$  desencadena un mecanismo, ya sea nervioso o humoral, que posee sensores periféricos y actúa a nivel central; o bien, la otra posibilidad es que el interferon sea extremadamente potente y unas cuantas moléculas sean capaces de inducir un importante efecto. Existen datos en la literatura que muestran que el interferon es una de las sustancias más potentes que existen, cuando menos en lo relacionado a su actividad antiviral. Se mostró que estas sustancias son capaces de inhibir la replicación viral en células sensibles en concentraciones tan bajas como  $3 \times 10^{-14}$  U.I. (100).

Con la idea de caracterizar en una forma más directa las acciones farmacológicas inducidas por la administración del interferon- $\alpha$ , decidimos modificar nuestro enfoque experimental e intentar realizar registros de una sola célula. De esta manera, determinaríamos las modificaciones en sus características electrofisiológicas después de la aplicación tópica de interferon- $\alpha$  empleando un procedimiento de microiontoforesis, y podríamos establecer la existencia de un efecto directo del interferon- $\alpha$  sobre las células nerviosas.

Mediante la técnica de microiontoforesis es posible liberar cantidades extremadamente pequeñas de sustancias ionizadas en la vecindad inmediata de la célula en la que se está efectuando el registro. Para ello, se manufactura un ensamble de micropipetas, las cuales se estiran, empleando calor y fuerza hasta lograr una punta de entre 6 y 12  $\mu\text{m}$ . Las diferentes micropipetas se llenan con soluciones de altas concentraciones de los diversos fármacos que se deseen aplicar.

Estos ensambles de micropipetas se introducen dentro de la porción del SNC que se desee registrar. Cada una de las diferentes micropipetas es conectada a un generador de corriente directa, el cual al aplicar corrientes de signo igual o contrario al fármaco puede expulsar o retener al fármaco ionizado dentro de la micropipeta. La cantidad del fármaco expulsado, dependerá básicamente de 3 factores: de la resistencia de la punta de la micropipeta, de la cantidad de corriente aplicada y de las propiedades fisicoquímicas del fármaco. De estas propiedades, las más importantes son la carga, el pH de la solución, el pK y el punto isoeléctrico del fármaco.

El interferon- $\alpha$  es una sustancia muy estable a pH neutro; posee una estructura peptídica con carga neta negativa y su pK es de aproximadamente de 6.8 (41). Aunque posee la limitante de tener un peso molecular entre 18 000 y 23 000 daltons, el interferon- $\alpha$  gracias a sus propiedades fisicoquímicas, es susceptible de ser aplicado por microiontoforesis.

En una etapa inicial, decidimos analizar los efectos de la aplicación microiontoforética en 2 estructuras cerebrales que

realizan una alta coordinación sensorimotora, y además, que mostraron, importantes efectos provocados por el interferon- $\alpha$  en nuestro estudio previo (22), estas son la corteza somatosensorial y el tálamo medial.

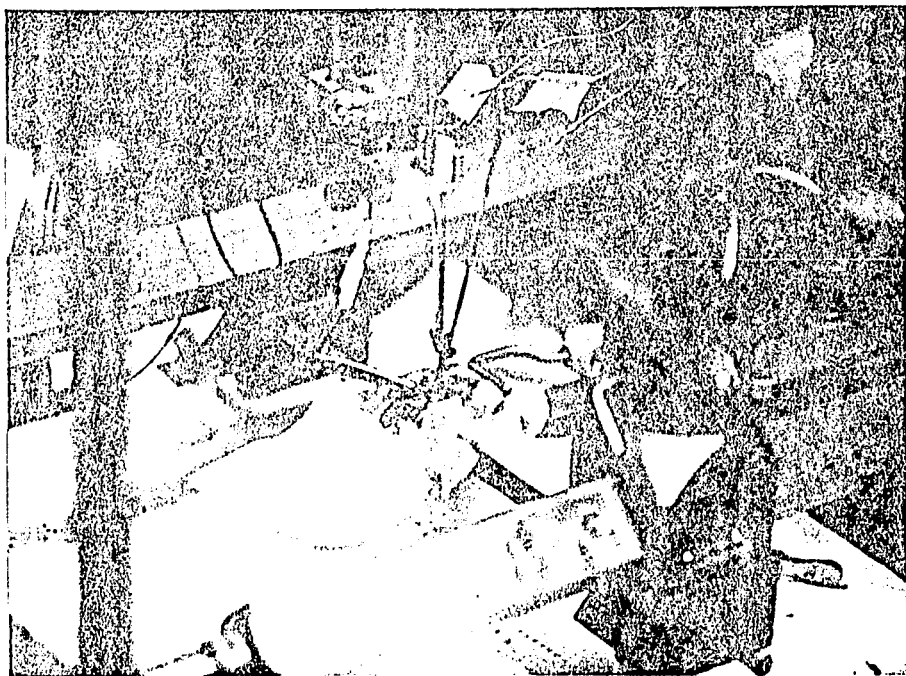


Fig. 2.- Los registros agudos de la actividad unitaria, en los cuales se realizó la aplicación microiontoforética de interferon- $\alpha$  se efectuaron en animales anestesiados con uretano y montados en un aparato estereotáxico como el que aquí se muestra. Tales experimentos, tenían una duración de 5 a 6 horas y siempre se procuró mantener a los animales en las mejores condiciones generales.

En este experimento (73) utilizamos ratas machos que fueron anestesiadas con uretano (1.25 g/kg). Los animales se fijaban en un estereotáxico, y después de una craneotomía se descendía el ensamble



de micropipetas hasta el sitio elegido (Fig. 2).

Utilizamos un ensamble de 4 micropipetas llenas con las siguientes soluciones: 1) interferon- $\alpha$ , proveniente de leucocitos, tomado de una solución de  $1 \times 10^6$  U.I./ml., este interferon poseía una actividad específica de  $2.4 \times 10^8$  U.I./mg de proteína, pH = 7.2; 2) L-glutamato 0.5 M, pH = 8.0, este aminoácido es una sustancia excitadora de la actividad unitaria celular, por lo que constituye una herramienta muy útil, para constatar la presencia y cercanía de células con poca actividad espontánea, así como para verificar la funcionalidad y la calidad del ensamble de micropipetas; 3) Azul cielo de pontamina al 2.5,% disuelto en una solución de acetato sódico al 0.5-M; pH = 5.6. Este colorante cuando es expulsado con corrientes catódicas se deposita en pequeñas cantidades en el sitio de registro, por lo tanto es un excelente medio para verificar, posteriormente, por métodos histológicos, la localización de la punta del ensamble de las micropipetas; 4) NaCl 4.0 M, esta micropipeta es utilizada para balancear la corriente. La existencia de este balance asegura un flujo neto de corriente con un valor de cero en la punta del ensamble, minimizando de esta manera, la posibilidad de una estimulación por corriente de las células cercanas a la punta del ensamble de micropipetas.

Finalmente un microelectrodo de registro (1-2  $\mu\text{m}$  en la punta, 15-28 M $\Omega$ , resistencia Ohmica) se fijaba con epoxy a un costado del ensamble de micropipetas. Este electrodo se colocaba de tal manera que su punta protuía entre 8 y 15  $\mu\text{m}$  por fuera de la punta de las otras micropipetas. De esta manera se aseguraba un registro óptimo con un electrodo de alta impedancia y una expulsión de fármacos

adecuada, empleando pipetas de baja resistencia.

Bajo estas circunstancias la aplicación microiontoforética de interferon- $\alpha$ , empleando corrientes catódicas que oscilaban entre 20 y 150 nA produjeron efectos significativos sobre la frecuencia de descarga de las unidades registradas. Estos efectos, los cuales desencadenaron un incremento importante de la frecuencia de descarga, se caracterizaron por mostrar una amplia latencia. Usualmente se requerían de 30 a 45 seg, después de iniciada la corriente de expulsión, para detectarse algún cambio de este parámetro (Fig. 3).

Los incrementos de la frecuencia de descarga se iniciaban en forma incidiosa para incrementarse paulatinamente. Estos efectos persistían aún tiempo después de interrumpir la corriente de expulsión del interferon- $\alpha$ . Generalmente, y dependiendo de la dosis estos efectos podían perdurar hasta 5 min. después de finalizada la corriente de expulsión. Los incrementos en la frecuencia de descarga provocados por la aplicación del interferon- $\alpha$ , siempre mostraron una ~~intensidad en una~~ relación directa con la dosis (Fig. 3). Después de la aplicación de cualquier dosis de interferon- $\alpha$  la frecuencia de descarga "espontánea" usualmente no regresaba a su condición basal, y se tornaba sumamente irregular.

Estos efectos son muy contrastantes cuando se comparan con los efectos de otros fármacos con acciones conocidas. Así, por ejemplo, la aplicación microiontoforética de L-glutamato a neuronas del mismo sitio (Fig. 5) provoca un incremento, también relacionado con la dosis, en la frecuencia de descarga. Sin embargo, los efectos desencadenados por este fármaco se inician solo después de 500 mseg. de iniciada la corriente de expulsión y terminan inmediatamente

después de finalizada ésta. Esta sustancia además no modifica el patrón de descarga espontáneo de estas neuronas.

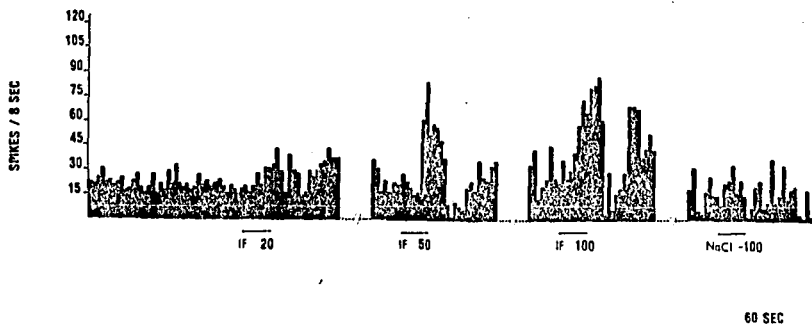


Fig. 3.- Histograma de frecuencias representativo de una unidad registrada en la corteza somatosensorial. La aplicación microiontóforética de interferon- $\alpha$  produjo un notable incremento de la frecuencia de descarga. La aplicación subsecuente de NaCl, no induce efecto alguno, lo que sugiere que el efecto es mediado por la presencia del interferon- $\alpha$  y no por la corriente de expulsión que se aplica. Los incrementos provocados por el interfeiron- $\alpha$  son de larga latencia y larga duración como se aprecia en la presente fotografía (tomada de 73).

La aplicación de interferon- $\alpha$  no solo modificó la frecuencia de descarga, también parámetros como el tamaño y el patrón del potencial de acción se modificaron considerablemente. En la Fig. 4, por ejemplo, se muestra el efecto depresor de la aplicación de 100 nA de interferon- $\alpha$  sobre el tamaño y la morfología de un potencial de acción registrado en la corteza cerebral; la reducción en el tamaño pudo ser de magnitud tal que la espiga desaparecía.

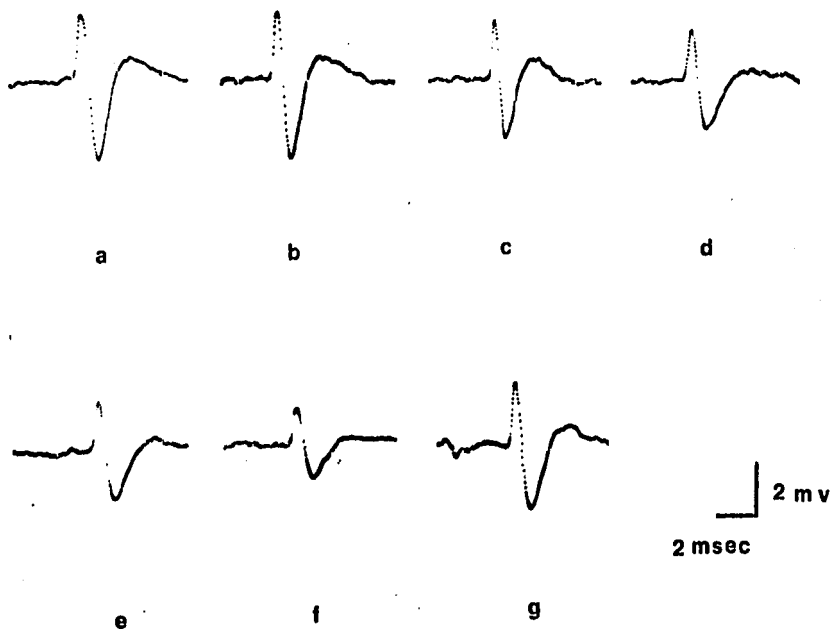


Fig. 4.-Fotografías secuenciales de una unidad cortical la cual muestra los efectos del interferon- $\alpha$  sobre las características de la forma y el tamaño del potencial de acción. La fotografía a, representa la espiga registrada inmediatamente antes del inicio de la corriente de expulsión del interferon- $\alpha$ , b, a la espiga durante la expulsión, y c, d, e y f; 30, 60, 90 y 120 segundos después de terminada esta corriente de expulsión, respectivamente. Cinco minutos después de finalizada la aplicación del interferon- $\alpha$ , la espiga mostró una casi completa recuperación, tal como se muestra en g (tómada de 73).

El potencial de acción generalmente era trifásico con un primer componente negativo, uno positivo siempre de mayor tamaño y finalmente un tercero negativo, generalmente de menor tamaño y mayor duración. Este último componente mostró la mayor sensibilidad al interferon- $\alpha$ , desapareció en el 90 % de las neuronas registradas y se

disminuía antes que los 2 restantes (Fig. 4). No obstante, los efectos del interferon- $\alpha$  sobre el tamaño y la morfología del potencial de acción registrado, fueron reversibles con el empleo de dosis de hasta 150 nA. Estos efectos podían durar hasta 15 min. antes de observar una completa recuperación.

Tanto el número de células afectadas como la intensidad del efecto se incrementó conforme la dosis fue en aumento (Fig. 3). La corteza somatosensorial mostró la mayor sensibilidad a los efectos del interferon, así, con aplicaciones de 150 nA de interferon- $\alpha$  se afectaron el 98 % de células corticales, mientras que sólo el 30 % de las unidades talámicas fueron afectadas por este interferon- $\alpha$ .

Estos resultados muestran la capacidad del interferon- $\alpha$  para afectar en forma directa las propiedades electrofisiológicas de las membranas celulares. Si estos efectos son específicos, es decir mediados a través de receptores específicos, o representan una acción indirecta, acoplamiento o asociaciones inespecíficas del interferon con algunas porciones de la membrana celular, es algo que no podemos dilucidar con estos resultados. En cierta manera, el dato de que el interferon- $\alpha$  afecta primordialmente a células de la corteza comparadas con las del tálamo, sugeriría cierta selectividad en las acciones del interferon- $\alpha$ . Sin embargo, sus efectos sobre el tamaño y características del potencial de acción, efectos similares a los provocados por los anestésicos locales cuyo mecanismo de acción es inespecífico (80) y el hecho de que su acción siempre fue excitadora con una dinámica temporal diferente a las sustancias endógenas, como es el caso del L-glutamato, sugieren que la acción del interferon es inespecífica.

Mucho más complicado sería el sugerir si estas acciones ejercidas por el interferon- $\alpha$  poseen algún significado funcional. No obstante las limitaciones en cuanto a la interpretación de los resultados, fué posible afirmar después de este estudio que los efectos colaterales descritos en los estudios clínicos, representan un efecto inducido por el interferon- $\alpha$  sobre el sistema nervioso central.

Aunque desconocemos la cantidad exacta de interferon- $\alpha$  que se liberó durante su administración microiontoforética con varias corrientes, es de suponerse que la cantidad de moléculas liberadas es muy pequeña, con base a estos resultados obtenidos, sugerimos que se trata de una molécula muy activa.

CUADRO 1

Número de células afectadas por la aplicación microiontoforética de interferon- $\alpha$  en unidades registradas en el hipotálamo ventromedial y el hipocampo dorsal. Consideramos que la unidad mostraba un cambio significativo solo si su frecuencia de descarga se modificaba en un 40 % durante la aplicación del interferon- $\alpha$ .

Dosis de Interferon (nA)	HIPOTALAMO				HIPOCAMPO			
	↑	↓	-	n	↑	↓	-	n
20	6	8	10	24	13	0	4	17
50	2	6	10	18	17	0	0	17
100	5	1	8	14	17	0	0	17

↑ Incremento ↓ Decremento - No cambio  
 n = Número total de células registradas con esa dosis en particular.

En realidad, fué necesario tener una idea más general sobre los sitios y características de los efectos producidos por el

interferon- $\alpha$ , de esta manera, en un trabajo subsecuente, decidimos empleando el mismo enfoque experimental y técnica, el registrar células del hipotálamo ventromedial y el hipocampo dorsal (66).

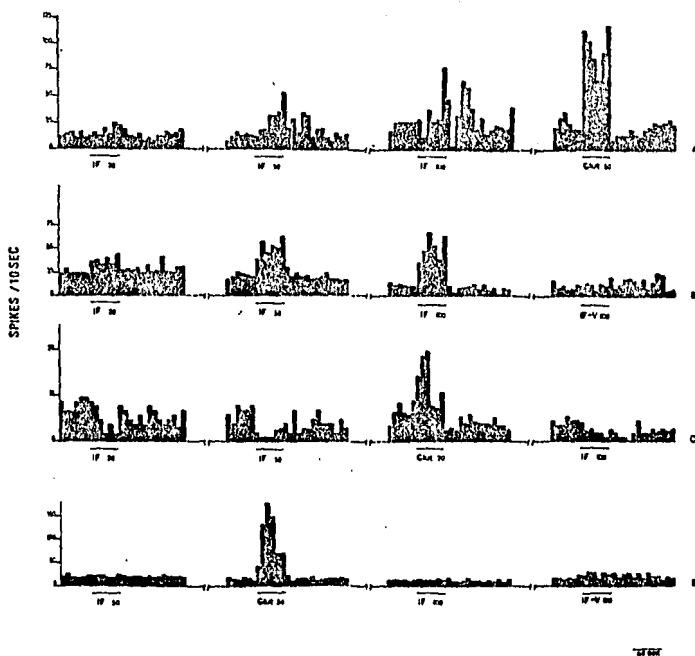


Fig. 5.- Histogramas de frecuencia, obtenidos después de que los datos originales fueron analizados por una computadora (DEC 11/03), los cuales muestran los efectos provocados por el interferon- $\alpha$  en el hipotálamo y el hipocampo. En A se observa un incremento de larga latencia y duración provocado por el interferon en el hipocampo, mientras que B, C y D muestran un incremento, un decremento y no efecto en 3 unidades hipotalámicas, respectivamente. En todas estas unidades el glutamato produjo su efecto característico, aún cuando su aplicación se realizó antes o después de la expulsión del interferon- $\alpha$  (tomada de 66).

Estas estructuras fueron elegidas, con base a varios antecedentes experimentales, existentes. El más importante se

relaciona con los efectos del interferon- $\alpha$  sobre algunos parámetros conductuales de alteraciones de la memoria, de la regulación simpática y de las secreciones hormonales (8). Lo que sugeriría que estas estructuras son blanco de los efectos del interferon- $\alpha$ .

Registramos 22 células hipotalámicas y 17 células hipocámpales consideramos como significativa cualquier modificación igual o mayor al 40% en la frecuencia de descarga espontánea. El cuadro 1 resume los resultados encontrados en este trabajo.

Tanto en el hipotálamo como en el hipocampo, las acciones de interferon- $\alpha$  tuvieron una presentación y terminación similar, esto es, una latencia de entre 30 a 45 seg. La duración de estos efectos también fue de varios minutos dependiendo de las dosis empleadas. El glutamato provocó en estas neuronas su efecto característico (Fig. 5). En estas mismas unidades el interferon- $\alpha$  también provocó cambios importantes en el tamaño y morfología del potencial de acción, similares a los observados en la corteza cerebral.

Nuevamente observamos una acción diferencial del interferon- $\alpha$  en ambas estructuras. Las unidades del hipocampo mostraron una alta sensibilidad a los efectos del interferon- $\alpha$ . El único efecto observado fue un incremento en la frecuencia de descarga, el cual con una dosis de 100 nA, se manifestó en el 100 % de las unidades registradas. Cabe mencionar que en condiciones basales, algunas de las unidades (n=6) mostraban descargas simples con una frecuencia promedio de  $4.1 \pm 0.9$  espigas/seg., mientras que el resto (n=11) mostró una descarga en trenes de 3 a 5 espigas con una frecuencia media de  $9.2 \pm 1.3$  espigas/seg. Estos 2 tipos de unidades tienen una procedencia celular diferente. Es probable que las descargas en



trenes o ráfagas tengan su origen en interneuronas hipocampales, mientras que las descargas simples provienen ya sea de células piramidales o bien de otras neuronas de entrada (94). Como la acción del interferon- $\alpha$  se manifestó sobre los 2 tipos de descarga y como consecuencia, afectó a diferentes tipos de células hipocampales, es de sugerir que esto representa un efecto inespecífico.

Sin embargo, en el hipotálamo los resultados fueron diferentes esta vez (Cuadro 1; Fig. 5). En esta estructura el 42 %; el 56 % y el 44% de las unidades registradas con 20, 50 y 100 nA, respectivamente, no mostraron respuesta significativa alguna a los efectos del interferon- $\alpha$ . Con las dosis menores (20 y 50 nA), el principal efecto observado fue una reducción en la frecuencia de descarga, mientras que con 100 nA el efecto fue un incremento de la misma (Fig. 5).

Las unidades hipotalámicas mostraron siempre descargas únicas; y poseían frecuencias bajas, el promedio de descarga espontánea fue de  $2.7 \pm 0.4$  espigas/seg., y 21 de las 24 unidades poseía una frecuencia menor a 5 espigas/seg.

Esto sugiere una mayor homogeneidad en los grupos celulares que lo conforman. En esta situación los efectos inducidos por el interferon- $\alpha$  muestran una mucho mayor selectividad; aunque no existen datos suficientes para postular un efecto específico en esta estructura.

Algunos de los problemas que impiden definir una acción selectiva por parte del interferon- $\alpha$  sobre grupos celulares particulares, pueden ser resueltos si analizamos los efectos inducidos por varias sustancias provenientes de la misma familia, esto es, podríamos observar los efectos de la aplicación de

diferentes interferones, pertenecientes ya sea a diferentes familias u obtenidos por diferentes métodos. Estudios inmunológicos han mostrado que estos interferones poseen ciertas homologías en cuanto a su estructura, pero mucho más homologías en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas. Las modificaciones estructurales podrían alterar sus efectos específicos y selectivos, más que a los efectos inespecíficos, los cuales dependerían básicamente de sus propiedades fisicoquímicas.

Con estas ideas en mente realizamos un estudio en el que comparamos los efectos de 4 diferentes tipos de interferon- $\alpha$  y un tipo de interferon- $\gamma$  (73). Decidimos registrar los efectos de estos interferones en células corticales e hipocámpales las cuales fueron las estructuras que mostraron la mayor sensibilidad y uniformidad en cuanto a sus respuestas al interferon- $\alpha$ .

En este experimento usamos un ensamble de 8 micropipetas, de tal manera que podíamos inyectar cualquier tipo o tipos de interferon empleado a todas las células que registraríamos. Este ensamble de micropipetas contenía: 1) Interferon- $\alpha$  recombinante  $1 \times 10^6$  U.I./ml; pH=6.0 con una actividad específica de  $2.4 \times 10^6$  unidades por mg de proteína. 2) Interferon- $\alpha$  crudo proveniente de donadores humanos  $1 \times 10^6$  U.I./ml., pH = 6.5 y con una actividad específica de  $3.3 \times 10^5$  unidades por mg de proteína. 3) Interferon- $\alpha$  proveniente de cultivos de leucocitos humanos  $1 \times 10^6$  U.I./ml., pH=6.0 y una actividad específica de  $1 \times 10^6$  unidades por mg de proteína. 4) Interferon- $\alpha$ , proveniente de leucocitos y purificado cromatográficamente, lo que lo convierte en un interferon más homogéneo, al separar péptidos menores a 17 000 o mayores a 23 000

daltons. La concentración de este interferon- $\alpha$  fue de  $1 \times 10^6$  U.I./ml., pH=7.0 y una actividad específica de  $10^{7.3}$  unidades/mg de proteína. 5) Interferon- $\gamma$  parcialmente purificado  $1 \times 10^6$  U.I./ml., pH=6.0 y poseía una actividad específica de  $1 \times 10^7$  unidades por mg de proteína. 6) L-glutamato, 0.1 M, pH=8.0. 7) Azul cielo de pontamina 2.5 % de una solución de citrato de sodio 0.5 M. Estas 2 últimas soluciones fueron empleadas para determinar la funcionalidad del ensamble de micropipetas y marcar los sitios de registro, respectivamente.

Finalmente una octava micropipeta fue llenada con albúmina humana al 10 %, esta solución fue utilizada como solución de balance y para probar los efectos del vehículo del interferon- $\alpha$ . El electrodo de registro se preparaba aisladamente y se unía con epoxy al ensamble.

Con este tipo de interferones registramos 72 unidades, 36 de ellas provenientes de la corteza somatosensorial y 36 unidades registradas en el hipocampo dorsal. En las 72 unidades se realizó la microiontoforesis de albúmina. La aplicación de algún interferon- $\alpha$  se realizó sólo en 16 unidades mientras que el interferon- $\gamma$  fue probado en 34 unidades de cada estructura. Los resultados de este estudio se resumen en el cuadro 2.

La actividad espontánea promedio de las células del hipocampo fue de  $6.4 \pm 1.1$  (rango de 0.4 a 28) espigas/segundo. Mientras que las unidades corticales mostraron frecuencias promedio de  $5.2 \pm 0.3$  (rango de 0.01 a 19.8) espigas/segundo.

El interferon- $\alpha$  afectó el 94 y el 100 % de las unidades hipocámpales y corticales, respectivamente; mientras que el

interferon- $\gamma$ , prácticamente no ejerció efecto alguno. Si consideramos que la homología estructural entre la familia de interferones- $\alpha$  y  $\gamma$  es menor del 15 % (59), mientras que la menor homología estructural existente entre los diferentes tipos de interferones- $\alpha$  es del 75 % (96) estos efectos sugieren cierta selectividad o especificidad relacionada con la estructura.

CUADRO 2

Efecto de la aplicación microiontoforética de diversos tipos de interferon- $\alpha$ , provenientes de diferentes orígenes y métodos de purificación, y de un interferon- $\gamma$ . Las concentraciones y actividades específicas de cada uno de ellos se describen en el texto.

		HIPOCAMPO		
n		20	50	100 nA
ALBUMINA 10%	36	NP	NP	--
IFN- $\alpha$ -CRUDO	16	7 (60%)	14 (111%)	15 (248%)
IFN- $\alpha$ -RECOMB.	16	4 (44%)	12 (80%)	15 (177%)
IFN- $\alpha$ -LEU.	16	--	4 (59%)	9 (84%)
IFN- $\alpha$ -LEU. PUR.	16	--	4 (63%)	5 (61%)
IFN- $\gamma$	24	--	1 (43%)	--
L-GLUTAMATO	34	33 (97%)	NP	NP
		CORTEZA SOMATOSENSORIAL		
n		20	50	100 nA
ALBUMINA 10%	36	NP	NP	--
IFN- $\alpha$ -CRUDO	16	7 (59%)	12 (103%)	16 (189%)
IFN- $\alpha$ -RECOMB.	16	4 (48%)	12 (87%)	16 (150%)
IFN- $\alpha$ -LEU.	16	--	1 (65%)	8 (87%)
IFN- $\alpha$ -LEU. PUR.	16	1 (42%)	4 (71%)	10 (88%)
IFN- $\gamma$	24	--	--	--
L-GLUTAMATO	30	27 (129%)	NP	NP

IFN = Interferon NP = no probado. nA = corriente en nano-Amperios. n = número de células probadas con el respectivo fármaco.

Los porcentajes entre paréntesis representan el incremento aproximado en la frecuencia de descarga espontánea, observado durante la aplicación del interferon.

Las preparaciones de interferon- $\alpha$  crudo, proveniente de plasma

humano a través de métodos de purificación, afectó al mayor número de células produciendo también los efectos más intensos (Fig. 6). También la duración del efecto fue mayor con este tipo de interferón. Por su parte el interferón- $\alpha$  recombinante mostró un efecto mayor que el interferón proveniente de cultivos de leucocitos pero menor que el provocado por el crudo. Ambos tipos de interferones leucocitarios afectaron al menor tipo de unidades y con la menor intensidad (Fig. 6).

En estas circunstancias los interferones provocaron también cambios sobre el tamaño y morfología del potencial de acción. Sin embargo, la aplicación microiontoforética de L-glutamato provocó sus efectos característicos aún después de que la célula había sido afectada por el interferón- $\alpha$ , es decir, la aplicación de interferón no modificó las características de la respuesta de las células a otros fármacos (Fig. 6).

Estos resultados aunque de ninguna manera son concluyentes, si sugieren la existencia de una acción selectiva del interferón- $\alpha$  en las diferentes estructuras nerviosas, probablemente estos efectos no sean consecuencia de la asociación del interferón con aquellos receptores que median las acciones antivirales y antiproliferativa (14) puesto que estos receptores son específicos de especie. Por lo tanto estos efectos podrían representar la interacción entre el interferón- $\alpha$  y sistemas específicos de neurotransmisores cerebrales. El mecanismo que emplea el interferón para modificar la actividad eléctrica celular aún es materia de estudios actuales.

Como consecuencia y complemento de estos estudios resultó necesario el estudiar, en este modelo experimental, los efectos de la

administración de interferon- $\alpha$  sobre algunos de los parámetros conductuales reportados por los estudios clínicos.

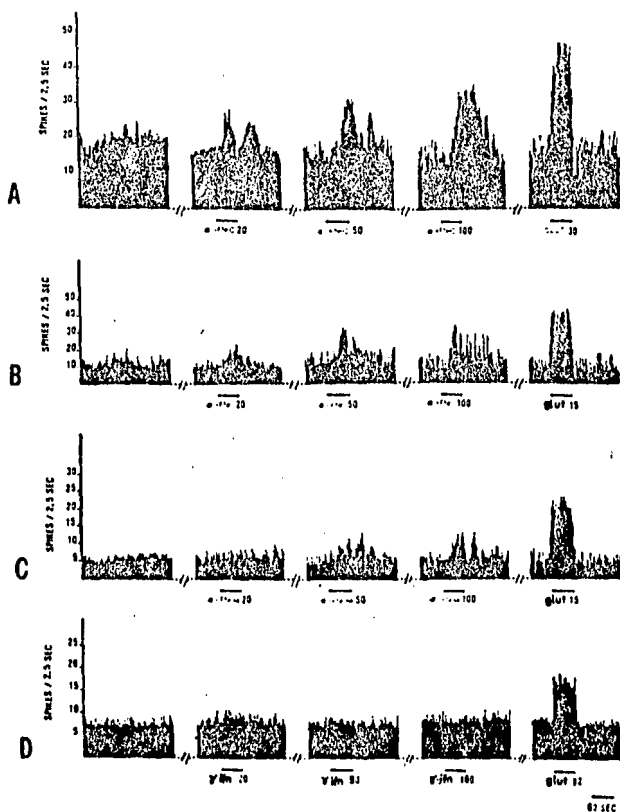


Fig. 6.- Histogramas de frecuencia representativos, los cuales muestra los efectos provocados por 4 diferentes tipos de interferon- $\alpha$  y un interferon- $\gamma$ , sobre 4 diferentes unidades corticales. La primera columna representa la actividad espontánea control y la última muestra los efectos de la microiontophoresis del L-glutamato, los números indican la corriente de expulsión en nA (tomado de 75).

Los reportes iniciales sobre la toxicidad del interferon mencionan que la fiebre y la anorexia constituyen los dos signos que se presentan invariablemente en los pacientes tratados con interferon- $\alpha$  (85). En el caso de la fiebre, los posibles mecanismos de producción por una sustancia de carácter inmunomodulador, como es el caso del interferon- $\alpha$ , son múltiples; sin embargo, en el caso de la anorexia ésta puede representar, ya sea un efecto sobre el sistema gastrointestinal o bien, un efecto directo del interferon sobre el hipotálamo; nuestros estudios previos (66) mostraron que el hipotálamo ventromedial, considerado como el centro de la saciedad (57), es sensible a los efectos del interferon- $\alpha$  administrado intraperitonealmente, por lo que decidimos analizar la posible existencia de un efecto central.

Con estos antecedentes diseñamos un modelo experimental gracias al cual, nos fuese posible analizar los efectos del interferon- $\alpha$  sobre la ingesta de alimentos. Este modelo experimental implica la realización de un estudio conductual y un estudio electrofisiológico.

En el primer caso, analizamos la ingesta de alimentos a través de determinar la curva ponderal de animales integros, de animales con lesión en el hipotálamo lateral, de animales que recibieron una aplicación intracerebroventricular de 1500 U.I. de interferon- $\alpha$  durante 10 días, y en animales que además de recibir interferon tenían una lesión en el hipotálamo lateral.

La ingesta de alimentos está controlada básicamente por estructuras hipotalámicas, el hipotálamo ventromedial, conocido como el "centro la saciedad" y el hipotálamo lateral o "centro del

hambre". Varios estudios conductuales muestran que la estimulación del hipotálamo ventromedial ó del hipotálamo lateral provoca un estado conductual muy similar al que muestran animales saciados o muy hambrientos, respectivamente; mientras que su lesión provoca los efectos contrarios. Es decir, un animal con una lesión ventromedial muestra una hiperfagia importante, mientras que la anorexia surge como consecuencia de la lesión del hipotálamo lateral (33).

Existen además múltiples interacciones entre ambos "centros" de tal manera que la activación o la desactivación de alguno de ellos modifica en forma directa e importante la actividad del otro (60).

La aplicación intracerebroventricular del interferon- $\alpha$  provocará la difusión de esta sustancia, en estructuras periventriculares, como es el caso del hipotálamo, sobre todo del hipotálamo ventromedial, el cual además carece de barrera hematoencefálica. Es de esperarse que si el interferon induce un efecto anoréxico directo, éste se manifestará después de su administración intracerebroventricular, la cual probablemente provocará una difusión mínima de esta sustancia hacia la circulación sistémica, pues sólo un porcentaje mínimo de interferon atravieza la barrera hematoencefálica (11).

Para realizar este experimento colocamos 5 grupos (n=30) de ratas Wistar machos,  $128 \pm 12.6$  g al inicio del experimento, en jaulas metabólicas individuales. Previamente a 3 grupos (n=18) de estos animales se les implantaron en una sesión quirúrgica, canulas de acero inoxidable de 0.6 mm de diámetro externo en uno de los ventrículos laterales. Otros 2 grupos de estos sujetos (n=12) fueron sometidos a una lesión electrolítica del hipotálamo lateral. Las



coordinadas, empleadas fueron tomadas del Atlas Estereotáxico de König y Klippel y corresponden a aquellos sitios cuya destrucción se asocia más frecuentemente con un cuadro de hipofagia más intenso (60).

Las lesiones electrolíticas se realizaron empleando una corriente de 5 mA durante 30 segundos, se empleó un electrodo de acero inoxidable (130  $\mu$ m) cubierto con teflón. Los animales de uno de estos grupos tenían además cánulas intracerebroventriculares implantadas. Siete días después del acto quirúrgico estos animales se colocaban dentro de estas jaulas y el experimento se iniciaba.

Los animales tenían acceso libre al alimento y al agua. Durante 30 días se determinó el peso corporal de los animales a las 9:00 A.M. y posteriormente se cuantificaba la cantidad de alimento y agua ingerida durante las últimas 24 horas, además de medirse la cantidad de excretas de cada uno de los sujetos.

El grupo I (n=6) estaba constituido por sujetos integros cuya curva ponderal de peso corporal sirvió como control para su comparación con el resto de grupos, el grupo II estaba formado por 6 ratas implantadas con cánulas intracerebroventriculares, y a las cuales se les administró únicamente 3  $\mu$ l de solución isotónica durante los primeros 10 días del experimento. El grupo III se constituyó con 6 ratas que exclusivamente tenían una lesión electrolítica del hipotálamo lateral. Seis animales constituían el grupo IV, estos animales poseían cánulas intracerebroventriculares y recibieron 10 administraciones cerebrales de interferon- $\alpha$  crudo. La dosis administrada fué de 1500 U.I. diarias, disueltas en 3  $\mu$ l. Tal cantidad corresponde al 1 % de las dosis empleada clínicamente, y al porcentaje de la misma, la cual supuestamente atraviesa la barrera

hematoencefálica. La infusión de 3  $\mu$ l ya sea de solución salina o de interferon se realizaba empleando una microjeringa y una velocidad de 1  $\mu$ l por minuto. Finalmente, el grupo V estaba formado por ratas a las cuales además de efectuárseles una lesión electrolítica del hipotálamo lateral, tenían una cánula de acero inoxidable colocada intracerebroventricularmente, por lo cual también recibieron una dosis diaria de 1 500 U.I. de interferon- $\alpha$  durante 10 días.

Los resultados encontrados en este estudio (78) se observan en la Figura 7. La curva ponderal del peso corporal de los sujetos controles mostró un incremento constante a lo largo de los 30 días de duración del experimento. En este tiempo los sujetos incrementaron ~~en~~ 32% de su peso corporal. Los sujetos del grupo II, los cuales recibieron 10 aplicaciones intracerebroventriculares de solución isotónica, mostraron una curva ponderal del peso corporal muy similar a la desarrollada por los animales controles.

La lesión del hipotálamo lateral produjo una disminución significativa en el peso corporal de estos sujetos, la máxima reducción se alcanzó alrededor de los 10 días, tiempo en el que se presenta una reducción de hasta el 30 %, en promedio, del peso corporal con respecto a la situación control, posteriormente el sujeto incrementó su peso corporal, aunque nunca al mismo nivel que los sujetos controles.

Por otro lado, la aplicación intracerebroventricular de 1500 U.I. de interferon- $\alpha$  durante 10 días provocó una importante reducción del peso corporal durante el tiempo de su administración. Este efecto, el cual provoca una caída máxima alrededor del día 6, alcanza una reducción del  $23 \pm 4.2$  %. Sin embargo, al terminar las 10

aplicaciones intracerebroventriculares de interferon- $\alpha$ ; la curva ponderal del peso corporal de los sujetos tiende hacia el incremento, aunque no recupera los niveles encontrados en los sujetos controles.

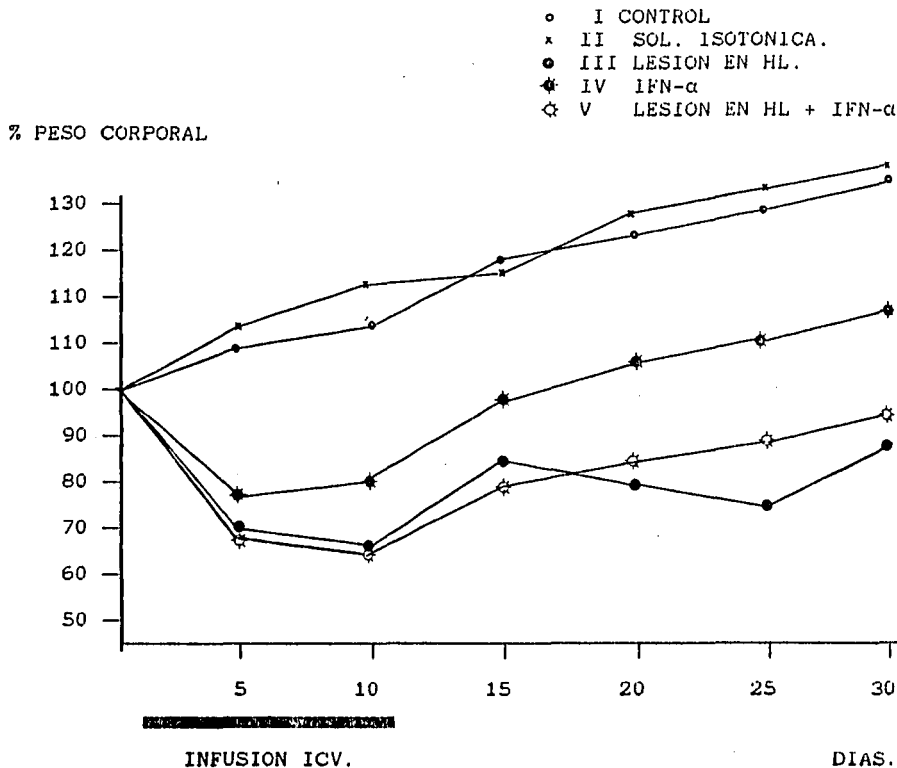


Fig. 7.-Curvas ponderales del peso corporal de los 5 diferentes grupos de animales empleados en este experimento. El efecto más pronunciado lo provocó la lesión del hipotálamo lateral. Sin embargo, la sola aplicación intracerebroventricular del interferon- $\alpha$ , produce un importante cuadro de hipofagia (tomada de 78).

Finalmente, la curva ponderal del peso corporal de los animales a los cuales además de lesionar el hipotálamo lateral se les administró interferon- $\alpha$ , es muy similar a la de los sujetos que

fueron sometidos sólo a la lesión electrolítica del hipotálamo lateral (Fig. 7). La carencia de un efecto aditivo o potenciador, resultado de combinar la lesión electrolítica con la administración de interferon- $\alpha$ , sugiere que el hipotálamo lateral está mediando los efectos anoréxicos del interferon- $\alpha$ .

El otro enfoque experimental de tipo electrofisiológico, consistió en analizar los efectos de la aplicación directa en el hipotálamo lateral de una infusión de 1500 U.I. de interferon- $\alpha$ , sobre la actividad mioeléctrica del intestino. Quizá este es uno de los mejores modelos para determinar la actividad anoréxica central de un fármaco (16).

En la rata, el perro y el hombre, la actividad mioeléctrica del intestino muestra 2 patrones característicos denominados digestivos e interdigestivos o de ayuno. Este último patrón el cual sólo se presenta en estados de ayuno (mínimo 6 horas después de ingerir alimento) consta de 3 fases identificables por registros electromiográficos. La primera fase se caracteriza por la presencia de ondas lentas 3-4 seg., en la segunda se encuentran espigas de variados voltajes y poca frecuencia que se superponen sobre las ondas lentas. La fase 3 es reconocida por la presencia de una gran cantidad de espigas con desaparición de ondas lentas; generalmente estas espigas se presentan en trenes o ráfagas pueden poseer frecuencias de hasta de 40 espigas/segundo (Fig. 8). Esta última fase se asocia con contracciones intensas y amplias del estómago y el intestino, las cuales se ha sugerido constituyen las así denominadas contracciones de "hambre" (28).

Estas tres fases conocidas como el complejo mioeléctrico

migrante, se desplaza a todo lo largo del intestino delgado, tomándoles aproximadamente 20 minutos en recorrer el intestino de la rata. Lo realmente interesante de este modelo es que la ingesta de alimentos, o la infusión de soluciones hiperproteicas o hipercalóricas cambian el patrón interdigestivo por un patrón digestivo, el cual consiste de espigas únicas montadas sobre las ondas lentas (82). De igual manera la estimulación eléctrica del hipotálamo ventromedial bloquea la aparición de este complejo mioeléctrico migrante (30).

Conductualmente, cuando al animal se le bloquea este complejo, por alguno de los procedimientos antes mencionados, deja de ingerir alimento independientemente del periodo de ayuno previo. Por tal motivo el complejo mioeléctrico migrante es un excelente índice fisiológico y objetivo del estado alimenticio del individuo. Por tal razón, decidimos analizar la acción del interferon- $\alpha$  sobre este valioso parámetro fisiológico.

Seleccionamos ratas Wistar (200-250 g) las cuales fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg IP), para implantarles electrodos en el intestino delgado y una cánula intracerebroventricular o un cateter intravenoso en forma crónica. Cuatro electrodos bipolares de plata se suturaron sobre la pared del intestino delgado. El primero de ellos, se colocó inmediatamente por debajo del ligamento de Treitz, y los 3 restantes mas distales a intervalos de 10 cms. Los alambres de los electrodos fueron introducidos subcutáneamente hacia el area interescapular de la rata donde se conectaban a un conector que se fijaba a la piel.

Los experimentos se iniciaron una semana despues de la

cirugía, cuando la condición física de los animales fue similar a la observada antes de la lesión. El día de los experimentos después de un ayuno de 18 a 24 horas las ratas fueron conectadas a un conmutador, el cual mantenía el contacto físico entre los electrodos y los aparatos de registro independientemente del movimiento del animal.

### MIGRATING MYOELECTRIC COMPLEX OF RAT SMALL INTESTINE

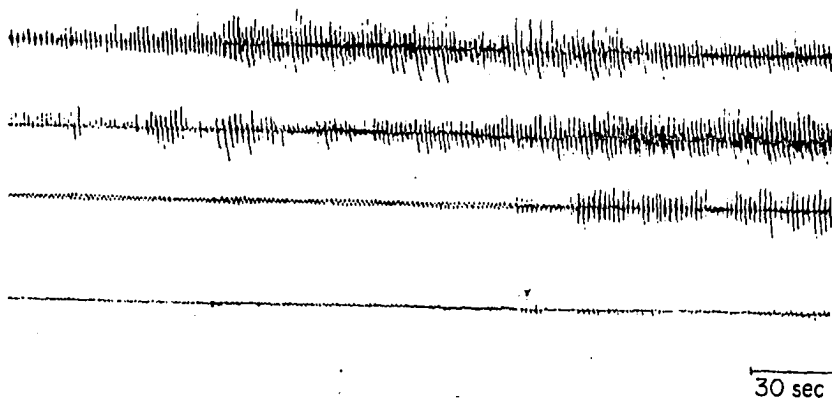


Fig. 8.-Trazos poligráficos seleccionados, los cuales muestran las III diferentes fases que constituyen el complejo mioeléctrico migrante en la rata. El trazo superior muestra una fase III característica, en la que se observan trenes de espigas con alta frecuencia y alto voltaje. El siguiente trazo muestra en su porción izquierda la fase II y en la derecha la transición entre la fase II y la fase III. En el tercer trazo, se observa una fase I seguida de un período de transición entre esta fase y la fase II. Finalmente el trazo inferior constituye una fase I característica (tomada de 29).

La actividad mioeléctrica del intestino fue registrada empleando un polígrafo cuya salida se conectaba en línea con una microcomputadora (DEC 11/03), la cual elaboraba histogramas de frecuencia, y acumulativos. Después de un registro control de una hora, se iniciaba una infusión ya sea intracerebroventricular o intravenosa de interferon- $\alpha$  ó de solución salina isotónica (0.9 %). Ambas infusiones se realizaban durante una hora, y contenían 1500 U.I. de interferon- $\alpha$  para la dosis intracerebroventricular, o 250 U.I./g de peso corporal para la administración intravenosa. Los volúmenes administrados fueron de 20  $\mu$ l y de 600  $\mu$ l para la administración intracerebroventricular y la intravenosa, respectivamente.

La actividad mioeléctrica intestinal fué registrada durante 2 horas más después de la infusión ya sea de interferon o de solución salina. En un grupo de 3 ratas controles además de la infusión de solución salina se realizó, con la ayuda de un cateter gástrico, la instilación de 6 ml de leche condensada con la finalidad de probar la responsividad del modelo experimental.

Los resultados encontrados en <sup>dicho</sup> ~~el~~ presente estudio (29) muestran que en la situación control y en todos los animales con un ayuno de 24 horas (Fig 9A) observamos la presencia de aproximadamente 2 complejos mioeléctricos migrantes por cada 20 min. Tales complejos mostraron una duración de entre 4.8 a 7.3 min. y alcanzaron una frecuencia de hasta 225 espigas/min. en promedio. Estos complejos se manifestaron en una forma muy regular y constante. En la porción B de la misma figura se aprecia el efecto de la infusión intragástrica de 5 ml de leche condensada, tal infusión se inicia en el minuto 40. En

esta situación hay un bloqueo importante del complejo mioeléctrico migrante el cual se observó en las 3 ratas en que se administró. En su lugar, únicamente se observa una actividad eléctrica irregular que no muestra patrón secuencial alguno.

Un efecto bloqueador similar puede ser también provocado por la estimulación del hipotálamo ventromedial, como se observa en la figura 10 A; este efecto fué provocado en una rata con 18 horas de ayuno que poseía electrodos bipolares de estimulación en el hipotálamo ventromedial. En este sujeto en particular, se emplearon pulsos bifásicos de 5 Hz; 0.1 msec., y 0.2 mA, como parámetros de estimulación. Aunque en otros animales implantados fue necesario modificar los parámetros de estimulación, este efecto fue consistente en todos los sujetos estimulados. Conductualmente, con esta estimulación se bloqueó cualquier intento del animal de ingerir alimento, no obstante su ayuno de 18 horas (29).

La infusión de interferon- $\alpha$ , ya sea por vía intracerebral o por vía intravenosa provocó también un efecto similar. La figura 10 B, muestra el efecto de 1500 U.I. aplicadas en forma intracerebral sobre el complejo mioeléctrico migrante. Este efecto bloqueador, el cual es similar al provocado por la estimulación del hipotálamo ventromedial o por la administración intragástrica de alimento, sugiere fuertemente un efecto del interferon- $\alpha$  sobre los mecanismos fisiológicos que regulan la ingesta de alimentos.

En este sentido los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el interferon- $\alpha$  es capaz de ejercer un efecto modulador o inhibidor en forma directa y específica sobre una función específica como lo es la ingesta de alimentos.



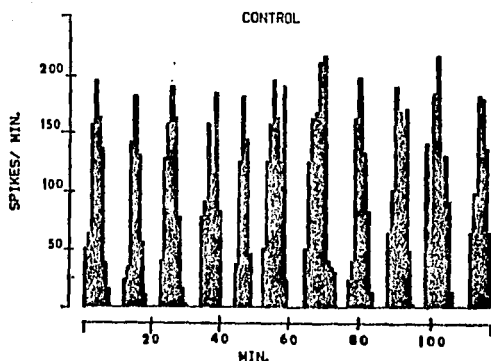


FIG 6A.

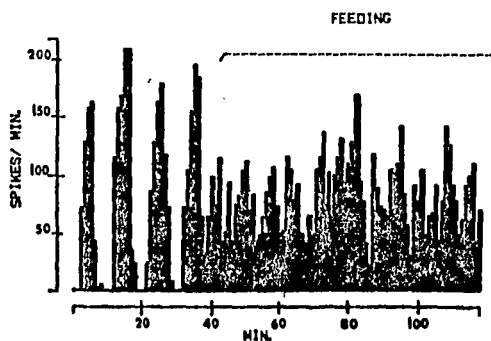


FIG 6B.

Fig. 9.-Histogramas de frecuencias obtenidos una vez analizada la actividad eléctrica intestinal correspondiente al complejo mioeléctrico migrante. En la parte A de la figura, se muestra la situación control. Mientras que B, representa el efecto de la instilación de leche condensada en el estómago del animal. Se muestra como el patrón característico se pierde después de realizar tal maniobra experimental (tomada de 29).

Evidentemente, con base a estos resultados es posible postular varias hipótesis, o más francamente es posible especular sobre hechos clínicos conocidos. Por ejemplo, en general en padecimientos infectocontagiosos, ya sea por virus o por bacterias; uno de los primeros síntomas que se presentan es la anorexia, esta complicación

del cuadro coincide temporalmente con el inicio del incremento en los niveles de interferon que se produce en estos cuadros clínicos (13).

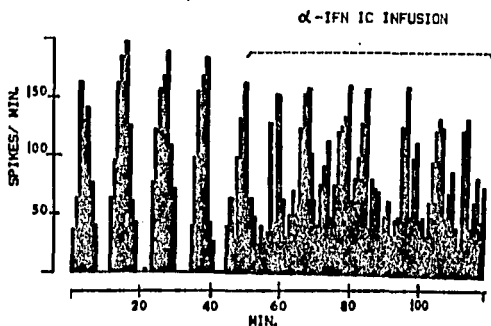
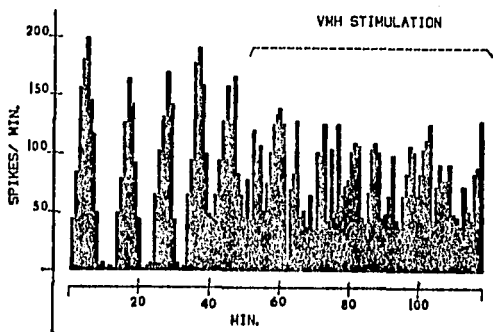


Fig 10.-En esta figura se muestra el efecto de la estimulación eléctrica del hipotálamo ventromedial y de la aplicación intracerebroventricular de 1500 U.I de interferon- $\alpha$ , sobre el complejo mioeléctrico migrante. Ambas maniobras experimentales provocaron una desaparición del complejo mioeléctrico migrante. En su lugar, apareció una actividad irregular sin un patron característico. Esto sugiere, que ambas maniobras cambian el patron de actividad interdigestiva a un patron digestivo, similar al que se observa cuando el sujeto ingiere alimento (tomado de 29).

De esta manera, es posible que algunos de los síntomas neurológicos que se presentan durante las infecciones, tales como la anorexia, el sueño, la debilidad muscular, o incluso la fiebre, etc.,

sean consecuencia de una acción neurológica del interferon. Como apoyo a esta sugerencia recientemente se mostró que el interferon- $\alpha$ , incrementa en forma significativa el sueño de onda lenta en conejos (52).

Desde este punto de vista el interferon- $\alpha$  constituiría no solamente una sustancia antiviral o antiproliferativa, ya que muchas de sus funciones se localizan fuera del panorama inmunológico. Los datos de los trabajos aquí relatados nos permiten sugerir que el interferon- $\alpha$  constituye un puente de unión entre el sistema inmune y el sistema nervioso central.

En realidad durante, mucho tiempo se ha considerado que el cerebro está relativamente aislado del sistema inmunológico, debido principalmente a la carencia de vasos linfáticos y a la presencia de la barrera hemato-encefálica, la cual limita la penetración de linfocitos circulantes y de anticuerpos (27). Sin embargo, existen datos en la literatura los cuales muestran que esto no es necesariamente cierto. Por ejemplo, Raff y cols., (68) mostraron que las células mesogliales cerebrales son probablemente precursores de macrófagos los cuales muestran receptores FC para Inmunoglobulinas y son células de tipo fagocitarias. Adicionalmente se aislaron células madre hematopoyéticas pluripotenciales del cerebro de ratones adultos (2).

Datos obtenidos, por laboratorios diferentes al nuestro, han mostrado que el cerebro es capaz de responder a posibles señales originadas en el sistema inmunológico. En este sentido Besedovsky y Cols., (4) mostraron que durante una respuesta inmune hay un intercambio de "mensajes humorales" entre el cerebro y las células

inmunológicas, lo que resulta entonces en una modificación de las funciones cerebrales. Esta modificación se manifiesta por un cambio en la frecuencia de descarga de las neuronas hipotalámicas mediales (5). Adicionalmente las lesiones electrolíticas o la estimulación de varias estructuras cerebrales influyen sobre las respuestas inmunes ya sea en una forma directa o a través de cambios en el sistema endócrino (49, 89). Estos trabajos adicionales a nuestros hallazgos, sugieren fuertemente la existencia de una comunicación importante entre el sistema inmunológico y el sistema nervioso central (24).

Por otro lado existen datos que muestran la existencia de una comunicación entre el sistema nervioso central y el sistema inmune; ésta comunicación se establece a través de sustancias neuroendócrinas y hormonales. Desde hace mucho tiempo, por ejemplo, se conocen los efectos inmunomoduladores que poseen los corticoesteroides, cuya liberación es regulada por todo un sistema neuroendócrino cerebral (56). Recientemente también se mostró que los opioides son sustancias con efectos poderosos sobre el sistema inmune; por ejemplo, se observó que las endorfinas poseen la capacidad de suprimir la actividad de las células asesinas naturales (87) así como de promover la formación de rosetas de linfocitos T (34). Varios autores muestran la existencia de receptores a las  $\beta$ -endorfinas en células inmunológicas (98). Curiosamente estos receptores a las  $\beta$ -endorfinas y a la morfina parecen ser diferentes a los localizados dentro del sistema nervioso central (44).

Todos estos datos son una fuerte evidencia que muestra la existencia de un circuito funcional entre los sistemas inmune y neuroendócrino. Supuestamente en casos de infecciones, tumores e

intoxicaciones por algunas sustancias químicas; los linfocitos podrían alertar al cerebro y a otros órganos o glándulas a través de la producción de hormonas con acción neuroendócrina (algunas de las cuales podrían ser el interferon- $\alpha$  y otros productos de secreción linfocítica).

La alta potencia que posee el interferon- $\alpha$  sobre el sistema nervioso central sugiere que sólo se requieren cantidades mínimas para echar a andar este sistema, tales niveles mínimos probablemente se alcancen durante las infecciones. Desde un punto de vista general, este supuesto circuito regulador inmune-neuroendócrino, constituye un posible y nuevo sistema de control homeostático, así como también un probable sitio etiológico para algunos estados psicopatológicos. Por ejemplo este circuito podría explicar alguno de los efectos que el interferon ejerce sobre algunos cuadros psiquiátricos. Así en 1980; Cantell y Cols., (18) publicaron un artículo en el cual observaron el efecto de la administración del interferon- $\alpha$  en 4 pacientes con esquizofrenia y 2 con depresión psicótica. Los 4 pacientes con esquizofrenia mostraron una mejoría significativa durante el tratamiento con 3 millones de U.I. diarias de interferon- $\alpha$  y retornaron a su estado previo, cuando se les interrumpió el tratamiento o se les administró una sustancia placebo. Los autores desconocen la causa de la mejoría desencadenada por la administración de interferon (18)

Aunque nuestros resultados, sirvieron de base para postular la existencia de este circuito inmuno-neuroendócrino (24), el principal problema que nos planteamos al principio de nuestro estudio sobre interferon- $\alpha$ , y que fue el investigar el mecanismo de acción de los

efectos cerebrales del mismo, aún no estaba resuelto.

En este sentido, se publicaron una serie de trabajos bioquímicos, los cuales mostraron la existencia de relaciones tanto estructurales como biológicas entre el interferon- $\alpha$ , la hormona corticotrófica y las endorfinas. Así, Blalock (6), mostro que la actividad del interferon- $\alpha$  humano fue bloqueada por antisueros, anti- $\alpha$ -corticotrofina, y anti- $\gamma$ -endorfina. Este bloqueo ocurría en una forma dependiente de la dosis y fue específico para interferon- $\alpha$  puesto que no bloqueó la actividad de interferon- $\beta$  o de interferon- $\gamma$  (6).

El hecho de que estos efectos bloqueadores de la actividad del interferon- $\alpha$ , sean realizados de igual manera por sueros anti- $\alpha$ -corticotrofina y anti- $\gamma$ -endorfina, resulta comprensible si se considera que ambas sustancias derivan de la misma molécula precursora; la cual es inmunoprecipitable por antisueros específicos ya sea contra la hormona corticotrofica o contra las endorfinas (54).

Según Blalock (6), estos resultados sugieren que el interferon- $\alpha$  parece contener una estructura similar a las endorfinas dentro de su composición de aminoácidos. Esta sugerencia es adicionalmente apoyada por una posterior observación realizada por este mismo autor, la cual mostro que la adición de un antisuero anti-interferon- $\alpha$  neutraliza también la actividad de la hormona corticotrófica, además de que la neutralización de la bioactividad del interferon- $\alpha$  por la adición de antisuero en contra de este interferon, fue bloqueada, aunque parcialmente, por la hormona corticotrofina (6).

De acuerdo a este autor, una prueba concluyente de esta similitud estructural fueron los resultados obtenidos después de fragmentar a la molécula del interferon- $\alpha$  humano, empleando pepsina. En estas circunstancias, la actividad antiviral del interferon- $\alpha$  desapareció, pero aparecieron varios péptidos, uno de ellos con actividad similar a la hormona corticotrófica. Este fragmento fue neutralizado por el antisuero anti- $\alpha$ -corticotrofina y poseía un peso molecular mayor de 100 pero menor de 5000. Lo que estructuralmente correspondería al fragmento bioactivo 1-14 de la hormona corticotrofina (6).

Por otro lado, la digestión de interferon- $\beta$  por pepsina, no provocó la aparición de algún péptido con alguna de estas características. Este autor sugiere la posibilidad de que en el organismo puede haber una fragmentación del interferon- $\alpha$  que produzca péptidos con actividad similar a la hormona corticotrófica y a las endorfinas capaces de afectar el sistema neuroendocrino (6).

Otros datos que apoyan tales sugerencias fueron presentados por el mismo autor en otro interesante trabajo (9). En este caso se analizaron las propiedades opioides del interferon- $\alpha$ , a través de varios enfoques experimentales. En primer lugar, se realizó un estudio de la inhibición de la unión estereo-específica de la dihidromorfina tritiada en membranas obtenidas de neuronas cerebrales del ratón. Además, se analizó la inmovilidad producida por esta sustancia administrada también intracerebroventricularmente. Este efecto se cuantificó de acuerdo a una escala de " - a 4+ ". "4+" significaba la ausencia total del movimiento espontáneo y "-" indicaba una movilidad espontánea completa:

Finalmente se analizó la posibilidad de que el interferon- $\alpha$  posea un efecto analgésico similar al inducido por opioides mediante la prueba dolorimétrica de placa caliente. En este caso, se determinaba el tiempo que transcurría entre la colocación del animal en una superficie metálica calentada a  $50 \pm 0.5$  °C y el momento en que el animal se lamía las extremidades superiores. Los autores consideraron un efecto analgésico máximo (100 %) si el animal al cual se le administró el fármaco, no mostraba la conducta de lamerse las patas anteriores durante 60 segundos después de colocarlos en la placa caliente. El 0 % de analgesia, correspondía al valor obtenido en los animales controles, el cual en sus pruebas fue de  $22.4 \pm 2.2$  segundos. En esta prueba, los autores utilizaron naloxona para intentar prevenir o bloquear estos efectos analgésicos.

Todas estas pruebas se realizaron durante la aplicación de interferon  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; así como de morfina y  $\beta$ -endorfina. Los animales controles recibieron soluciones salinas isotónicas. Los resultados encontrados por estos autores se resumen en los cuadros 3 y 4.

Los resultados encontrados en este estudio (8) muestran que el interferon- $\alpha$  pero no el  $\beta$  o el  $\gamma$  inhiben la unión estereoespecífica de la dihidromorfina tritiada y poseen un importante efecto analgésico.

Estos hallazgos son consistentes con los resultados que relacionaron antígenicamente al interferon- $\alpha$  con la endorfina- $\gamma$  y la  $\alpha$ -corticotrofina. Este autor, comparó la dosis requerida para provocar la inhibición del 50% de unión específica ( $I_{50}$ ). Para el caso del interferon- $\alpha$  con una actividad específica de  $1 \times 10^{8.3}$  U.I./mg de proteína, la  $I_{50}$  sería de 5000 U.I./mg, lo que corresponde



a cerca de  $10^{-9}$  M, esto lo cual representa casi 320 veces mas actividad que la morfina ( $I_{50}$ ) aprox.  $3.2 \times 10^{-7}$  sobre bases molares. Esta molaridad y cantidades molares fueron calculadas sobre la base de una actividad especifica de  $10^{6.3}$  U.I./mg de proteínas y un peso molecular de 20 000 daltons.

CUADRO 3.

Efectos de diferentes tipos de interferon sobre el desplazamiento de la unión estereo-especifica de morfina en membranas de células de cerebro de ratón y en la actividad locomotora espontánea. La aplicación de todos los fármacos mostrados en la tabla se realizó en uno de los ventriculos laterales del cerebro (tomado de 9).

FARMACO (dosis UI)	% de inhibición de la unión de H-dihidromorfina	INMOVILIDAD
Solución salina	0	-
Interferon- $\beta$ $10^4$ UI/mg (500 UI)	0	-
Interferon- $\gamma$ $10^5$ UI/mg (250 UI)	1.3	-
Interferon- $\alpha$ $10^4$ UI/mg (250 UI)	30.2	2+
(500 UI)	45.4	4+
$10^6$ UI/mg (7500 UI)	65.0	4+
(1500 UI)	13.8	2+
$10^8$ UI/mg (5000 UI)	49.5	4+
(2500 UI)	30.1	4+
$\beta$ -endorfina (5 $\mu$ g)	100.0	3+
morfina (10 $\mu$ g)	100.0	4+
(3.3 $\mu$ g)	71.1	4+

U.I. = Unidades Internacionales.

U.I/mg = Actividad especifica del interferon.

CUADRO 4.

Efecto de la aplicación intracerebroventricular de diferentes tipos de interferon sobre la prueba dolorimétrica de placa caliente en ratón. Los valores que se muestran corresponden a el promedio del grupo  $\pm$  la desviación estándar (tomado de 9).

FARMACO (dosis)	ACTIVIDAD ANALGESICA tiempo de respuesta en segundos $\pm$ d.s. (porcentaje de analgesia)		
	sin naloxona	reversión por naloxona	pretrat. con naloxona
Solución salina	22.4 $\pm$ 2.2 (0.0)	NP	NP
Interferon- $\beta$ 10 <sup>6</sup> UI/mg (500 UI)	22.5 $\pm$ 1.7 (0.2)	NP	NP
Interferon- $\gamma$ 10 <sup>5</sup> UI/mg (250 UI)	24.3 $\pm$ 2.1 (5.0)	NP	NP
Interferon- $\alpha$ 10 <sup>4</sup> UI/mg (250 UI)	45.3 $\pm$ 12.7 (60.9)	NP	NP
(500 UI)	59.0 $\pm$ 3.3 (97.3)	22.1 $\pm$ 6.0 (0.0)	23.7 $\pm$ 1.2 (3.4)
10 <sup>6</sup> UI/mg (7500 UI)	60.0 $\pm$ 0.0 (100.0)	21.8 $\pm$ 6.2 (6.2)	NP
(1500 UI)	54.0 $\pm$ 12.0 (84.0)	25.3 $\pm$ 5.0 (7.7)	NP
10 <sup>8</sup> UI/mg (5000 UI)	58.5 $\pm$ 8.5 (96.0)	23.5 $\pm$ 5.0 (2.9)	NP
(2500 UI)	53.4 $\pm$ 9.2 (88.4)	28.5 $\pm$ 3.9 (16.2)	NP
$\beta$ -endorfina (5 $\mu$ g)	49.3 $\pm$ 9.2 (71.5)	26.8 $\pm$ 7.1 (11.7)	NP
morfina (10 $\mu$ g)	60.0 $\pm$ 0.0 (100.0)	21.0 $\pm$ 10.6 (0.0)	NP
(3.3 $\mu$ g)	59.5 $\pm$ 1.0 (98.7)	22.2 $\pm$ 3.5 (0.0)	NP

En lo que respecta a la actividad locomotriz espontánea, estos autores mencionaron que es posible detectar cambios en tal parámetro después de 1 a 2 minutos de la aplicación intracerebroventricular del interferon- $\alpha$ . Estos cambios se caracterizan por la ausencia de movimientos espontáneos (sin parálisis motora, puesto que los animales se movían cuando se les motivaba a ello) y la presencia de catalepsia. Este estado cataléptico mostraba una "flexibilidad cerea" que mantenía al animal en posiciones extravagantes (Fig. 11). Tales efectos duraban de 15 a 30 minutos después de la aplicación y podían ser revertidos por la administración de naloxona.

En lo relacionado a los efectos analgésicos, estos también fueron provocados exclusivamente por el interferon- $\alpha$ , ni el interferon- $\beta$  ni el interferon- $\gamma$  mostraron alguna acción analgésica. Empleando los mismos datos de molaridad este autor concluye que el interferon- $\alpha$  es entre 8000 y 1000 veces más potente que la morfina y la  $\beta$ -endorfina, respectivamente, para provocar esta acción analgésica (9).

El bloqueo y/o la prevención de los efectos analgésicos del interferon- $\alpha$ , provocado por la administración de naloxona, sugiere que estos efectos analgésicos son mediados por receptores opioides.

De acuerdo con estos autores, los efectos inducidos por el interferon- $\alpha$  en el sistema nervioso central, podía ser una consecuencia de su interacción con receptores opioides. Sin embargo, de acuerdo a nuestros hallazgos electrofisiológicos esto parecería poco probable.

En nuestro laboratorio, hemos realizado varios trabajos que caracterizan los efectos electrofisiológicos de opioides en varias

estructuras cerebrales tales como el tálamo medial (72,76) y el hipotálamo ventromedial (67). En estos estudios observamos que la aplicación de morfina provoca principalmente un decremento de la frecuencia de descarga el cual es posible bloquear con naloxona. Pocas neuronas muestran un incremento en la frecuencia de descarga, como consecuencia de la acción de la morfina, además estos incrementos no son bloqueados por la naloxona, lo que sugiere efectos inespecíficos o no mediados por receptores opioides. En este sentido, y en estas mismas estructuras, la aplicación micointoforesis de interferon provocó exactamente el efecto opuesto al de la morfina.

En un intento de analizar experimentalmente la posible interacción entre los receptores opioides y el interferon- $\alpha$ , decidimos emprender 3 diferentes enfoques experimentales. El primero de ellos es conductual y consistió en observar la acción del interferon- $\alpha$  sobre el síndrome de carencia a los opioides, provocado por la administración de naloxona en ratas dependientes a la morfina. Elegimos este procedimiento porque estudios previos realizados en nuestro laboratorio habían caracterizado tanto conductual como electrofisiológicamente tal síndrome (76).

El síndrome de abstinencia o de carencia opioide puede ser provocado en animales que recibieron un tratamiento crónico con morfina, al interrumpir la administración del fármaco opioide, o por la administración de un antagonista. Este síndrome es una manifestación del fenómeno de tolerancia que se presenta cuando el opioide se administra en forma crónica. El síndrome de carencia generalmente es consecuencia de una acción de rebote, en la cual los síntomas fisiológicos que estaban deprimidos por acción del fármaco,

ahora muestran una excitabilidad exagerada mucho mayor que la que poseen en condiciones fisiológicas (45).

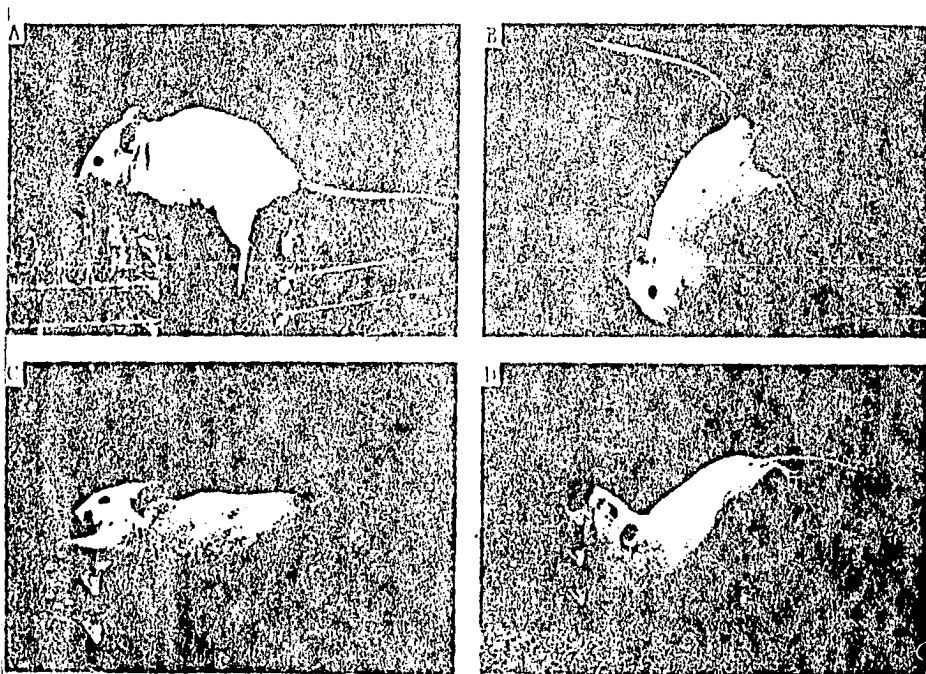


Fig. 11.-La aplicación intracerebroventricular de interferon- $\alpha$  provocó una inmovilidad muy similar a la provocada por fármacos opioides. Esta inmovilidad se acompañó de un cuadro catatónico con la presencia de una plasticidad cerea, la cual provocaba que el sujeto adoptase posturas poco comunes, como las que se observan en esta fotografía. Las fotografías en A y B fueron tomadas después de 5 minutos de inyectadas 500 U.I. de interferon- $\alpha$ . Los ratones en C y D permanecieron en tal posición por 20 minutos (tomada de 9).

Las ratas cuando se encuentran en abstinencia manifiestan un incremento generalizado en la actividad motora y una serie de movimientos estereotipados tales como sacudidas de todo el cuerpo, las cuales simulan los movimientos que realiza un perro mojado al

sacudirse y como consecuencia se les ha llamado "sacudidas de perro mojado", saltos, castaño de dientes, estiramiento del cuerpo, diarrea y una vocalización a manera de chillidos que el animal realiza cuando se le acercan objetos o se le toca suavemente la piel (97).

El síndrome de abstinencia se modifica en forma considerable cuando los animales son pretratados con fármacos opioides, tales como la  $\beta$ -endorfina (93) o con proteínas derivadas de la  $\beta$ -lipoproteína tal como la hormona estimulante de los melanocitos o la corticotrofina (3). De esta forma si el interferon- $\alpha$  posee algún efecto de índole opioide, éste modificará el desarrollo de la manifestación de síndrome de carencia en animales que recibieron un tratamiento crónico con morfina.

Con esta idea, se implantaron en forma subcutánea, bajo anestesia con éter 2 pastillas que contenían 75 mg de morfina base cada una, a 6 grupos de ratas Sprague-Dawley. Esta técnica mostró ser muy efectiva para el desarrollo de tolerancia física a los opioides (10). Después de 72 horas de implantación, los animales recibían una dosis de 1 mg/kg de naloxona (el antagonista opioide más potente), lo que desencadenaba el síndrome de carencia en pocos segundos.

Este síndrome se valoró por la presencia de 7 diferentes signos, 4 de ellos valorados cuantitativamente, es decir simplemente se contaba el número de veces que se presentaban, estos son: "sacudidas de perro mojado", castañeteo de dientes, número de descargas fecales y vocalización al ser tocado con un objeto romo. Otros 3 signos se valoraron cualitativamente y estos fueron: hiperactividad, conducta exploratoria y la presencia de diarrea, en

una escala de 0 a 5.

Para realizar un análisis estadístico de estos últimos signos, valorados cualitativamente, empleamos una transformación matemática. Primero el valor de 0 a 5 fue convertido a cifras porcentuales fraccionadas ( 0 = 0; 1 = 0.2; 2 = 0.4, etc.), con la finalidad de convertir estos datos discontinuos en variables continuas. Después se aplicó una transformación matemática empleando la siguiente función:

$$x = \arcseno \sqrt{x}$$

Tanto las variables, computadas cualitativamente como los resultados de esta transformación matemática fueron primero analizadas estadísticamente con una prueba de ANOVA y posteriormente se aplicó la prueba de Scheffé para identificar a los grupos que producían tal diferencia (84).

El protocolo de investigación consistió en implantar ratas con pastillas subcutáneas de morfina en el día 0, setenta y dos horas después se les provocaba el cuadro agudo de carencia con la aplicación intraperitoneal de la naloxona. Entonces, los animales se colocaban en una caja de plexiglass (35 X 40 X 30 cms) cubierta y se determinaban los signos antes mencionados. La observación conductual se realizaba durante 20 minutos, lo que corresponde a la duración del efecto máximo de la naloxona (45).

Empleamos 71 ratas Sprague-Dawley (180-250 g) para estos experimentos, el grupo I o grupo control, se constituyó por 19 ratas las cuales recibieron una implantación de pastillas de morfina y una inyección de naloxona 3 días después. El grupo II (n=8) además de la implantación con pastillas de morfina recibió una inyección

intraperitoneal de 500  $\mu$ l de una solución de albúmina al 10 %, la cual es el vehiculo del interferon- $\alpha$ . Esta sustancia se les administró 1 hora antes de aplicarles la naloxona.

Los grupos III (n=11), IV (n=18) y V (n=11), fueron implantados con pastillas de morfina y 3 días después recibieron la dosis correspondiente de naloxona. Una hora antes de la naloxona, se les realizó la administración intraperitoneal de interferon- $\alpha$  crudo a una dosis de 100, 150 y 200 U.I./g de peso corporal, respectivamente. Finalmente, el grupo VI (n=4) se constituyó por sujetos que además del tratamiento común con morfina y naloxona recibieron una dosis de 200 U.I./g de peso de interferon- $\gamma$  una hora antes de aplicada la naloxona.

Los resultados obtenidos de este experimento (23) podemos resumirlos en los cuadros 5 y 6.

Estos resultados muestran claramente que el interferon- $\alpha$ , pero no el interferon- $\gamma$ , modifica en forma importante el síndrome de abstinencia a los opioides. Este efecto, el cual fue dependiente de la dosis aunque sin importantes diferencias entre las dosis más altas, puede prolongarse por varios días, aunque la intensidad del mismo se va reduciendo (26).

El efecto bloqueador del síndrome de carencia es una característica de sustancias opioides como la  $\beta$ -endorfina u otros derivados de la  $\beta$ -lipoproteína (19). Aunque recientemente algunos fármacos adrenérgicos, tales como los agonistas  $\alpha_2$ , del tipo de la clonidina, pueden modificar sustancialmente este síndrome carencial (20). Estos resultados, nos muestran que el interferon- $\alpha$  posee acciones opioides, aunque no nos indica si estas acciones son



mediadas por una interacción directa con los receptores opioides.

CUADRO 5

Signos observados durante el síndrome de carencia precipitado en ratas dependientes a la morfina por la aplicación intraperitoneal de naloxona. Este cuadro muestra las diferencias estadísticas encontradas en los cuatro signos que fueron valorados cuantitativamente durante los 20 minutos posteriores a la aplicación de la naloxona (tomado de 23).

GRUPOS	OBSERVACIONES			
	sacudidas de perro mojado	castañeteo de dientes	descargas fecales	vocalización al contacto
CONTROL Mor-Nal. (n=19)	15.3±2.0	20.3±1.5	8.3±0.7	4.5±0.2
CONTROL Mor-Alb-Nal (n=8)	15.0±1.8	15.0±1.7	7.6±1.3	4.8±0.2
Mor-IFN $\alpha$ -Nal (100 U.I./g) (n=11)	7.5±1.5	8.2±1.7	3.6±0.9	2.6±0.7
Mor-IFN $\alpha$ -Nal (150 U.I./g) (n=18)	3.1±1.2	1.9±1.1	2.9±0.8	1.2±0.4
Mor-IFN $\alpha$ -Nal (200 U.I./g) (n=11)	1.8±0.8	2.8±1.1	3.1±0.9	1.0±0.4
Mor-IFN $\gamma$ -Nal (200 U.I./g) (n=4)	12.0±3.5	17.8±3.2	7.0±1.9	4.5±0.3

n = Número de sujetos en cada grupo.

En este momento decidimos retomar nuestros estudios electrofisiológicos y analizar en forma comparativa, los efectos inducidos por el interferon- $\alpha$  y la morfina sobre la actividad eléctrica de una sola célula cerebral. Nos interesa también la

posibilidad de producir una interacción entre los efectos provocados por estos fármacos y determinar la respuesta de la naloxona sobre las acciones de ambos fármacos.

CUADRO 6

Resumen de las diferencias estadísticas encontradas cuando se compararon los 3 signos valorados cualitativamente, durante el síndrome de carencia opioide. La valoración estadística se realizó una vez que estos signos fueron transformados matemáticamente. Se empleó la prueba de ANOVA y Scheffé para tal fin (tomado de 23).

GRUPOS	OBSERVACIONES		
	hiperactividad	conducta exploratoria	diarrea
CONTROL Mor-Nal. (n=19)	3.8±0.2	3.8±0.2	3.4±0.5
CONTROL Mor-Alb-Nal (n=8)	4.5±0.2	4.8±0.2	3.1±0.8
Mor-IFN $\alpha$ -Nal (100 U.I./g) (n=11)	1.6±0.5 *	1.6±0.5	0.7±0.3 *
Mor-IFN $\alpha$ -Nal (150 U.I./g) (n=18)	0.3±0.2 ***	0.4±0.2 ***	0.2±0.1 **
Mor-IFN $\alpha$ -Nal (200 U.I./g) (n=11)	0.6±0.3 **	0.3±0.2 ***	0.5±0.3 *
Mor-IFN $\gamma$ -Nal (200 U.I./g) (n=4)	4.3±0.3	3.3±0.5	3.0±0.6

Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar.

Significancia estadística = \* p < 0.05  
 \*\* p < 0.01  
 \*\*\* p < 0.005

En este estudio electrofisiológico, empleamos un ensamble de 6 micropipetas (4-8  $\mu$ m en la punta; 10-15 M $\Omega$ ), estas micropipetas

contenían: 1) Interferon- $\alpha$   $1 \times 10^6$  U.I./ml, pH = 6.0; 2) sulfato de morfina 0.045 M, pH = 4.5; 3) hidrocloreuro de naloxona, 0.01 M, pH = 5.0; 4) L-glutamato, 0.01 M, pH = 8.0; 5) Albúmina humana al 10 %, pH = 7.2 y 6) pontamina azul cielo al 2.5 %, disuelta en acetato sódico 0.5 M, pH = 7.2. Esta última solución fue empleada para marcar los sitios de registro y como solución para balancear la corriente de las otras micropipetas. El electrodo de registro se estiraba y preparaba por separado después se unía al ensamble con pegamento especial, empleando un estereoscopio. La punta de este electrodo siempre protua de 15 a 25  $\mu$ m con respecto a la punta del ensamble de micropipetas que contenían las soluciones que se aplicarían.

Para este trabajo (77) registramos 29 células de la corteza somatosensorial, provenientes de 13 ratas Sprague-Dawley (200-250 g). En estas unidades la morfina aplicada con corrientes de 5 a 50 nA produjo algún efecto en el 72 % (n=21) de las células registradas. De este porcentaje, 16 unidades fueron deprimidas por la aplicación microiontoforética de morfina (Fig 12) y sólo 5 mostraron algún tipo de incremento en su frecuencia de descarga.

Los efectos inhibidores de la morfina se presentaron en forma inmediata, estos alcanzaban el efecto máximo de 1 a 3 segundos después del inicio de la corriente y la recuperación se obtenía del a 2 segundos después de finalizar la corriente de iontoforesis. Estos cambios en la frecuencia de descarga no se acompañaron de cambios en la morfología o en el tamaño de las unidades registradas. La aplicación conjunta de naloxona y morfina, previn el efecto depresor de este último fármaco (Fig. 13), mientras que ninguna de las unidades excitadas por la morfina mostraron algún efecto bloqueador

al aplicar ambos fármacos en forma conjunta.

Estos resultados son muy similares a los encontrados en nuestro laboratorio (72, 74) y a los de otros laboratorios (83)

La aplicación microiontoforética del interferon- $\alpha$ , en dosis de 20 a 100 nA, provocó efectos muy similares a los encontrados previamente (73). Veintisiete células mostraron algún efecto excitador provocado por la aplicación de interfero- $\alpha$ , mientras que sólo 2 células no mostraron cambio alguno.

Las excitaciones provocadas por el interferon- $\alpha$ , mostraron nuevamente características de larga latencia (30-45 seg), larga duración (hasta 5 ó 6 min después de terminada la corriente de iontoforésis; Fig. 12) y efectos en la morfología y el tamaño del potencial de acción.

En 13 células afectadas por ambos fármacos, decidimos aplicar tanto morfina, en pulsos de 30 segundos, como interferon, una aplicación de 2 minutos, en forma conjunta.

El resultado de esta maniobra experimental se aprecia en la figura 14. En esta unidad la morfina provocó una disminución consistente de la frecuencia de descarga, mientras que la aplicación del interferon- $\alpha$  provocó un incremento de la misma, con las características antes mencionadas. Cuando ambas aplicaciones coincidieron temporalmente, el efecto del interferon- $\alpha$  fue preponderante y el de la morfina desapareció; aunque éste reapareció cuando el efecto del interferon- $\alpha$  hubo finalizado. No se observó algún efecto de suma o potenciación en estas aplicaciones, lo que sugiere que no existe ninguna interacción farmacológica entre estas sustancias.

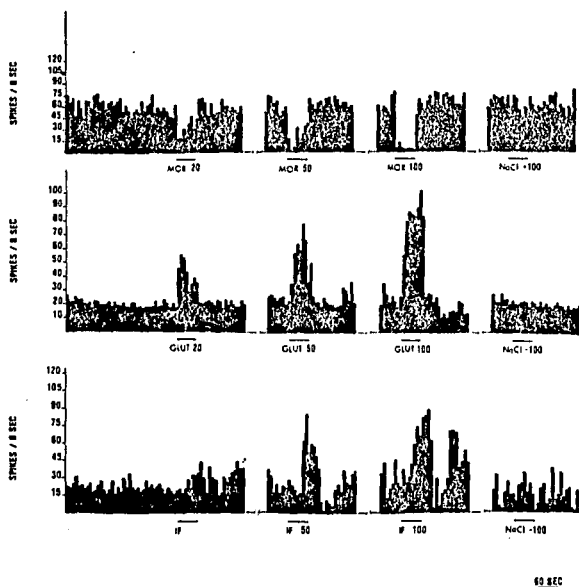


Fig. 12.- Histogramas de frecuencias donde se observa la dinámica de los efectos provocados por morfina, L-glutamato e interferon- $\alpha$ . Tanto la morfina como el L-glutamato provocan efectos que sólo ocurren cuando se aplica la corriente de expulsión. Estos efectos se relacionan con la dosis y son muy reproducibles. En las neuronas corticales la aplicación de morfina produjo principalmente un decremento de la actividad espontánea. Mientras que el interferon- $\alpha$  provocó el efecto opuesto en las mismas unidades. Las excitaciones provocadas por el interferon- $\alpha$  muestran características muy diferentes a las provocadas por el L-glutamato como se muestra en esta fotografía (tomado de 73).

También realizamos la aplicación conjunta de interferon- $\alpha$  con naloxona (Fig. 14). los efectos provocados por el interferon- $\alpha$  no se modificaron cuando este fármaco se aplicó en presencia de naloxona, lo que sugiere la existencia de un efecto no mediado por receptores opioides. Estos resultados de nuestros experimentos con

microiontoforesis en células corticales no apoyan la sugerencia de una interacción entre el interferon- $\alpha$  y los receptores opioides.

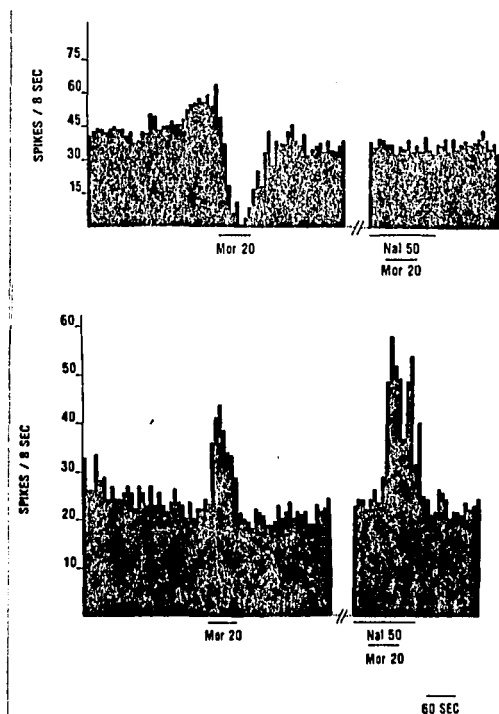


Fig. 13.- Los efectos depresores de la morfina, fueron fácilmente prevenidos por la aplicación previa, también por microiontoforesis, de naloxona. Mientras que las pocas excitaciones provocadas por este fármaco no fueron afectadas por la naloxona, lo que sugiere que este incremento en la frecuencia de descarga desencadenado por la morfina no es mediado por receptores opioides (tomado de 72).

Finalmente decidimos utilizar la preparación del músculo longitudinal del ileo de cobayo para determinar un efecto opioide del interferon- $\alpha$ . Esta es una preparación clásica utilizada durante mucho tiempo como un bioensayo para caracterizar efectos opioides de

algunos fármacos sobre la transmisión entre los nervios autónomos y el músculo liso intestinal (35).

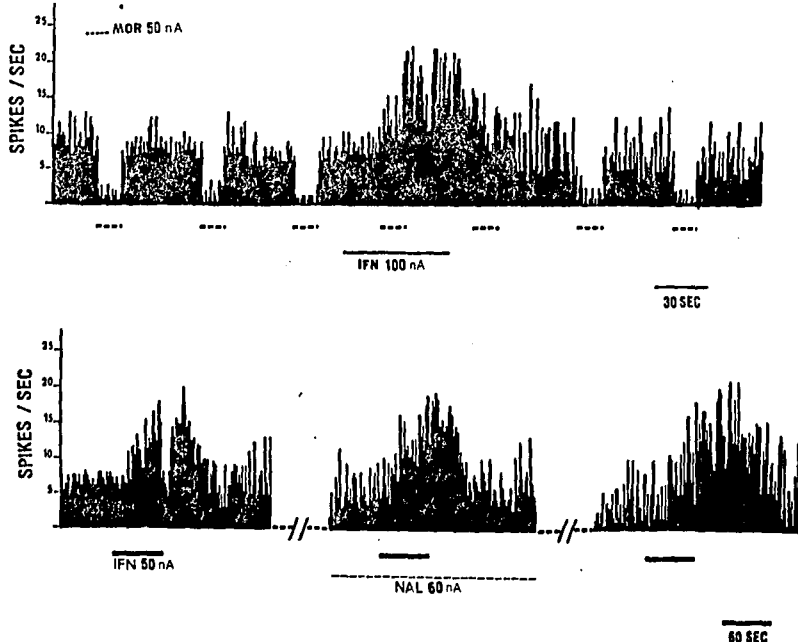


Fig. 14.- Histogramas de frecuencias, resultado de registrar la actividad unitaria de una neurona cortical en la cual realizamos la aplicación conjunta de interferon- $\alpha$  y morfina e interferon- $\alpha$  y naloxona. Ni la morfina ni la naloxona modificaron de alguna manera el efecto excitador provocado por la aplicación de interferon- $\alpha$  (tomada de 77)

En esta preparación los receptores opioides se localizan sobre las terminaciones neuromusculares, la activación de estos receptores por fármacos opioides inhibe la liberación de acetilcolina en estas uniones mioneurales (62). El uso de este modelo "simple", ha permitido la caracterización de varios receptores opioides y el

estudio de las interacciones agonista-antagonista de estos receptores (16).

Para realizar estos experimentos utilizamos cobayos machos (300-500 g), los cuales habian estado en ayuno previo por al menos 12 horas. Los animales fueron sacrificados con un golpe en el cuello, lo que garantizaba una muerte instantanea, se abria su abdomen y se extraia un segmento del ileo (siempre se descartaron los 10 últimos centímetros del ileo, los cuales corresponden a la unión ileocecal).

Tiras del intestino de aproximadamente 2 cms. de largo fueron suturadas y suspendidas entre 2 electrodos de estimulación de plata, localizados dentro de una cámara húmeda para tejido de 25 ml de capacidad. Esta cámara se llenaba con una solución de Krebs-bicarbonato la cual poseia la siguiente composición en mM: 147 Na<sup>+</sup>; 5.0 K<sup>+</sup>; 1.0 Mg<sup>2+</sup>; 1.5 Ca<sup>2+</sup>; 130 Cl<sup>-</sup>; 1.0 HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; 25 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y glucosa 11. La solución fue aerada constantemente con 95 % de O<sub>2</sub> + 5 % de CO<sub>2</sub>; el baño de tejidos siempre poseia un pH = 7.4 y una temperatura de 37 ± 0.5 °C.

Cada tira de tejido se conectó a un transductor de fuerza isométrico (Grass FT 0.03) de tal manera que sus contracciones pudiesen ser registradas sobre un poligrafo Beckman tipo R411. Las contracciones del músculo longitudinal de la preparación fueron provocadas por pulsos eléctricos supramáximos de 0.5 msec de duración, administrados a una frecuencia de 0.1 HZ.

Una vez montadas las tiras, se permitía que la preparación se equilibrara en el medio y se aplicaba una estimulación continua durante 60-90 minutos. Todos los fármacos fueron añadidos en volúmenes de menos de 100 µl y eliminados de la preparación al lavar



el intestino en aproximadamente 50 ml de solución de Krebs-bicarbonato fresca. Las respuestas a los fármacos se expresaron como un porcentaje de cambio para cada tira individual.

En la figura 15 es posible observar parte de los resultados encontrados (77). Registramos 11 tiras de músculo longitudinal, las contracciones en general ejercían una fuerza promedio de  $2.4 \pm 0.5$  g y fueron muy constantes a lo largo de todo el experimento. La agregación de morfina al baño provocó una reducción muy consistente en el tamaño de la contracción en una relación dosis respuesta muy evidente. Así, la adición al baño de 12.5 mM de morfina provocó una reducción del 18 al 23 % de la contracción muscular, mientras que una cantidad de 50 mM provocó una reducción del 90 al 95 % del mismo parámetro.

Estos decrementos en la contracción muscular provocados por la morfina fueron constantes y reproducibles cada vez que la misma dosis de morfina se añadía (Fig. 15), además de que tal efecto fue fácilmente reversible por la naloxona.

La adición del interferon- $\alpha$  al baño en dosis de  $1 \times 10^5$  a  $3 \times 10^5$  unidades no produjo cambios depresores de la contracción muscular. Después de 10 a 15 minutos de la administración del interferon- $\alpha$  se observó un incremento del 10 al 15 % en el tamaño de la contracción (Fig. 15). Cuando, bajo estas condiciones, se agregó morfina al baño, se obtuvieron reducciones en el tamaño de la contracción muy similares a las observadas cuando el tejido no estaba siendo influenciado por el interferon- $\alpha$ .

En 5 de las 11 tiras de intestino estudiadas, el efecto excitador del interferon- $\alpha$  fue muy importante.

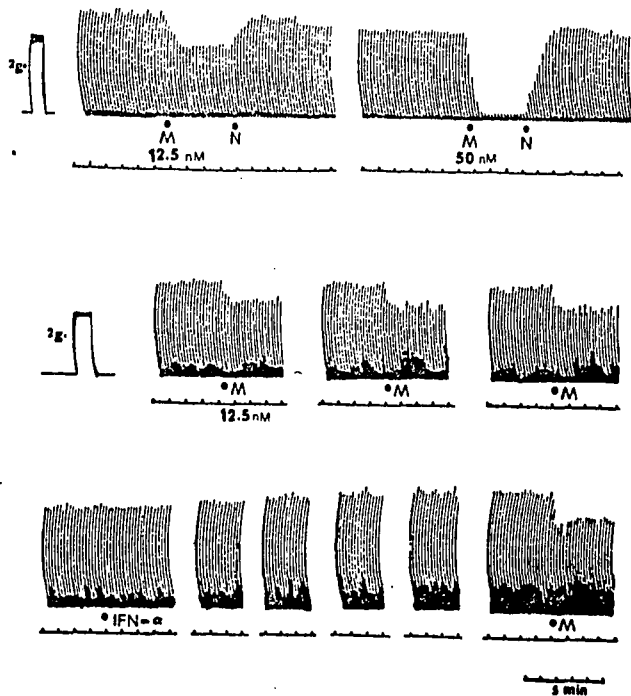


Fig. 15.- Registros poligráficos que representan contracciones de músculo liso intestinal de ileo de cobayo. Estas contracciones son provocadas por estimulación eléctrica. En los registros superiores se muestra el efecto depresor de la morfina y su reversión por naloxona. Este efecto depresor es dependiente de la dosis y reproducible. La agregación de interferon- $\alpha$  al baño del tejido solo provocó un ligero incremento en el tamaño de estas contracciones (tomado de 77).

En estos casos, se puso de manifiesto la actividad motora espontánea del intestino, la cual en condiciones controles está siendo bloqueada por la estimulación externa. La presencia de esta actividad espontánea, desorganiza en forma importante el patrón de contracción desencadenado por la estimulación eléctrica (Fig. 16). Aún en estas condiciones, al agregar la morfina a estos tejidos, el

efecto esperado todavía se observa. Al retirar el interferon- $\alpha$  del baño, el patrón de contracción provocado por la estimulación eléctrica tiende a recuperarse (Fig. 16).

Los resultados obtenidos de nuestros experimentos con músculo longitudinal del íleo de cobayo apoya nuestros hallazgos electrofisiológicos cerebrales. Es decir, el interferon- $\alpha$  no parece interactuar con receptores opioides. No obstante, en esta preparación el interferon- $\alpha$  también provocó efectos por demás interesantes. Quizá el más importante, fue el incremento en la actividad espontánea intestinal.

Estos hallazgos en músculo liso, y los observados en nuestros estudios cerebrales (73); así como los de otros autores en tejidos cerebrales aislados (17) y en tejidos cardíacos (7) indican que el interferon- $\alpha$  incrementa en forma importante la excitabilidad de estos tejidos. Quizá estos efectos del interferon- $\alpha$  sobre la excitabilidad de la musculatura lisa intestinal podrían explicar la diarrea crónica que se presenta muy frecuentemente en los pacientes sometidos a tratamientos repetidos con interferon- $\alpha$ .

Es importante mencionar que recientemente se han publicado algunos estudios donde se muestra que las similitudes inmunológicas encontradas entre el interferon- $\alpha$  y las sustancias derivadas de la  $\beta$ -lipoproteína pueden estar no necesariamente bien interpretadas (31), aunque otros estudios aún apoyan tal similitud (79), lo cual ha creado una gran controversia en torno a tales resultados.

Aunque aún desconocemos los mecanismos precisos que emplea el interferon- $\alpha$  para afectar al sistema nervioso central, los resultados encontrados en esta serie de trabajos aquí presentados, aunados a las evidencias mostradas por otros autores (95) aportan evidencias

suficientes que demuestran que el interferon- $\alpha$  no es solo un agente con propiedades antivirales y antiproliferativas. Nosotros consideramos que su influencia en condiciones fisiológicas se ejerce más allá de este campo.

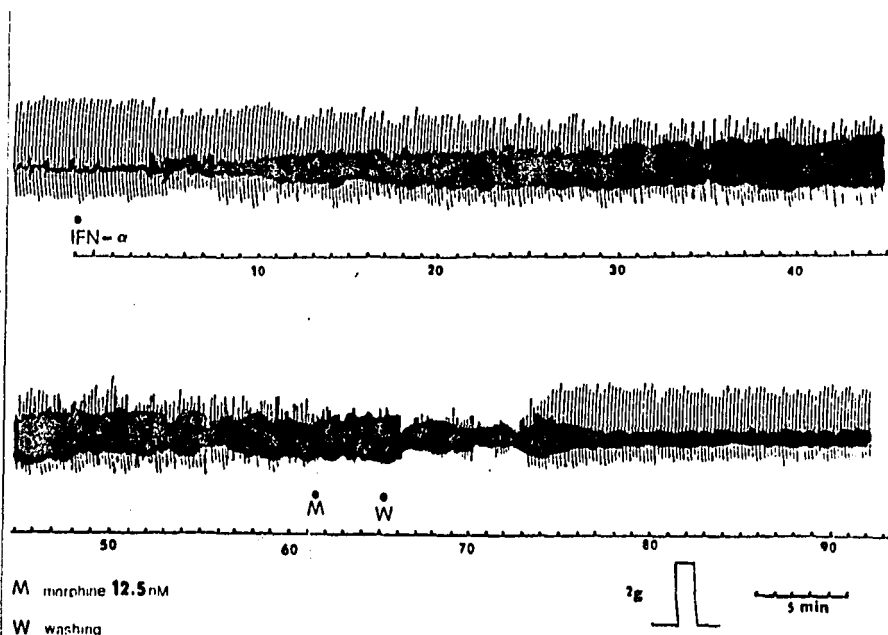


Fig. 16.- En 5 de 11 segmentos de intestino registrados, el interferon- $\alpha$  provocó un incremento importante en las contracciones espontáneas que posee este músculo. Este incremento desorganizó en forma importante el patrón de contracciones provocado por la estimulación eléctrica. Estos efectos fueron revertidos cuando el interferon- $\alpha$  se eliminó del baño, como se muestra en esta fotografía. Aún en estas circunstancias la agregación de morfina al baño provocó su efecto característico.

En nuestra opinión, el interferon- $\alpha$  posee un papel de

intermediario o de agente asociativo entre el sistema inmune del organismo y el sistema nervioso central. De esta manera, el interferon provoca cambios en la regulación homeostática, tales como fiebre, anorexia, hipomotilidad etc. en condiciones cuando el organismo ve amenazada su estabilidad por la presencia de organismos o sustancias químicas ajenas al cuerpo humano. (23).

Existen, sin embargo, otros autores que asignan un papel más general al interferon y lo consideran como una molécula reguladora de un gran número de procesos fisiológicos. En este sentido, se propone al interferon- $\alpha$  como una sustancia importante en la regulación neuroendocrina hormonal (7); en la completa regulación del sistema inmune y órganos paralelos (13); en la regulación de las funciones cromosómicas de muchas estirpes celulares (39) y la más amplia es la sugerencia de Zhdanov quien propone al interferon como una de las sustancias claves para la homeostasis de los organismos (99).

Son muchas las directrices que pueden tomarse después de realizados los trabajos que aquí se relatan. En primer lugar aún queda por describir un mecanismo de acción para los efectos cerebrales del interferon- $\alpha$ , los cuales ya nadie pone en duda. Estos efectos parecen poseer una dinámica y característica muy diferentes a sus efectos antivirales y antiproliferativos, los cuales son específicos de especie y son mediados por receptores conocidos.

Los enfoques experimentales para detectar los mecanismos de acción cerebral son múltiples, estos podían abarcar desde estudios con ligandos radioactivos para intentar encontrar sitios de unión específica, hasta interacciones farmacológicas con otros sistemas de neurotransmisores bien establecidos. En este sentido resulta

sumamente interesante el buscar una posible interacción con los sistemas noradrenérgicos cerebrales principalmente por sus acciones de índole opioide que posee.

Otro aspecto muy interesante que actualmente esta siendo estudiado por varios laboratorios es su participación ya sea como posible agente etiológico, o como un participante dinámico en algunos cuadros patológicos relacionados con alteraciones cerebrales (18, 55, 58, 88).

La primera descripción del interferon se realizó en 1957 (47), han transcurrido apenas 30 años y la cantidad de trabajos relacionados con esta sustancia ha progresado en forma explosiva, lo cual dado su potencialidad terapéutica no es sorprendente. La mayor parte de los investigadores que de una u otra forma hemos trabajado con el interferon estamos cautivados por esta sorprendente molécula.

## REFERENCIAS

- 1.- Atanasiu, P. and Chany, C.: Action d'un interferon provenant de cellules malignes sus l'infection experimentale du hamster nouveau-ne par le virus de polyome. Cr. Acad. Sci. (D). Paris, 251:1687-1689, 1960.
- 2.- Bartlett, P.F.: Pluripotential hemopoietic stem cells in adult mouse brain. Proc. Natl. Acad. Sci. 79:2722-2725, 1982.
- 3.- Bertolini, A., Poggioli, R. and Fratta, W.: Withdrawal symptoms in morphine-dependent rats intracerebroventrically injected with ACTH 1-24 and with  $\beta$ -MSH. Life Sci. 29:249-252, 1981.
- 4.- Besedovsky, H.O., Del-Rey, A.E. and Sorkin, E.: What do the immune system and the brain know about each other?. Immunol. Today 8:3-25, 1983.
- 5.- Besedovsky, H.O., Del-Rey, A.E., Sorkin, E., Da-Prada, M., Burri, R. and Honegger, C.: The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. Science 221:564-565, 1983.
- 6.- Blalock, J. E. and Smith, E. M.: Human leukocyte interferon. Structural and biological relatedness to adrenocorticotropic hormone and endorphins. Proc. Natl. Acad. Sci. 77:5972-5974, 1980.
- 7.- Blalock, J.E. and Stanton, J.D.: Common pathways of interferon and hormonal action. Nature 283:406-408, 1980.
- 8.- Blalock, J. E. and Smith, E. M.: Structure and function of interferon (IFN) and neuroendocrine hormones. In: The biology of the interferon system. De-Mayer, E., Galasso, G. and Schellekens, H. (eds). Elsevier/North Holland Press. 1981, pp. 93-99.
- 9.- Blalock, J.E. and Smith, E.M.: Human Leukocyte interferon (HuIFN- $\alpha$ ): potent endorphin-like opioid activity. Biochem. Biophys. Res. Comm. 101:472-478, 1981.
- 10.- Blasig, J., Herz, A., Reinhold, K. and Zieglansberger, S.: Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome in rats. Psychopharmacol. 33:19-38, 1973.
- 11.- Bocci, V.: Pharmacokinetic studies of interferons. Pharm. Ther. 13:421-440, 1981.
- 12.- Bocci, V., Paulesu, L., Muscetolla, M., Ricci, G. and Grasso, G.: The physiological interferon response. In: Physiology and pathology of interferon system. Borecky, L. and Lackovic, (eds). Karger, Publs. Basel. 1984, pp. 36-94.

- 13.- Bocci, V.: The physiological interferon response. *Immunol. Today* 6:7-9, 1985.
- 14.- Boliang, L. and Xinyuan, L.: Mechanism of interferon action, the discovery the interferon receptor. *Scientia Sinica*. 28:697-706, 1985.
- 15.- Branca, A.A., and Baglioni, C.: Binding to human cells of of [ I ] labelled alpha interferon produced in E coli evidence for distinct receptors for type I and II interferons. *Nature*, 294:768-770, 1981.
- 16.- Burks, T. F.: Actions of drugs on gastrointestinal motility. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Vol.1, Johnson, L. R. (ed). Raven Press, New York, 1981, pp. 495-516.
- 17.- Calvet, M. C. and Gresser, I.: Interferon enhances the excitability of cultured neurons. *Nature*, 278:558-560, 1979.
- 18.- Cantell, K., Pulkkinen, E., Elosuo, R. and Suominen, J.: Effect of interferon on severe psychiatric diseases. *Ann. Clin. Res.* 12:131-132, 1980.
- 19.- Collier, H.O.J., Francis, D.L. and Schneider, C.: Modification of morphine withdrawal by drugs interacting with neuronal mechanisms: some contradictions and their interpretation. *Nature* 237:220-223, 1972.
- 20.- Collier, H.O.J.: Cellular site for opiate dependence. *Nature* 283:625-629, 1980.
- 21.- Cheeseman, S. H., Henle, W., Rubin, R. H., Tolkoﬀ-Rubin, N. E., Cosimi, B., Cantell, K., Winkle, S., Herrin, J.T., Black, P. H., Russell, P. S. and Hirsch, M. S.: Epstein-Barr virus infection in renal recipients. Effects of antithymocyte globulin and interferon. *Ann. Int. Med.* 93:39-42, 1980.
- 22.- Dafny, N. and Reyes-Vázquez, C.: Interferon modifies EEG and EEG-like activity recorded from sensory, motor, and limbic system structures in freely behaving rats. *Neurotoxicology*, 4:235-240, 1983.
- 23.- Dafny, N., Zielinsky, M. and Reyes-Vázquez, C.: Alteration of morphine withdrawal to naloxone by interferon. *Neuropeptides* 3:453-463, 1983.
- 24.- Dafny, N., Prieto-Gómez, B. and Reyes-Vázquez, C.: Does the immune system communicate with the central nervous system ?. Interferon modifies central nervous activity. *J. Neuroimmunol.* 9:1-13, 1985.
- 25.- Dafny, N. and Reyes-Vázquez, C.: Three different types of  $\alpha$ -interferons alter naloxone-induced abstinence in morphine addicted rats. *Immunopharmacol.* 9:13-17, 1985.



- 26.- Dafny, N. and Reyes-Vázquez, C.: Single injection of three different preparations of  $\alpha$ -interferon modifies morphine abstinence signs for a prolonged period. *Inter. J. Neurosci.* 32:953-961, 1987.
- 27.- Darling, J. L., Hoyle, N. R. and Thomas, D. G. T.: Self and non-self in the brain. *Immunol. Today.* 2:176-181, 1981.
- 28.- Dusdieker, N. S. and Summers, R. W.: Longitudinal and circumferential spread of spike burts in canine jejunum in vivo. *Am. J. Physiol.* 239:G311-318, 1980.
- 29.- Eeckhout, C. and Reyes-Vázquez, C.: Effects of interferon on rat small intestinal myoelectric activity and transit. Submitted to *interferon*, 1987.
- 30.- Eeckhout, C. and Reyes-Vázquez, C.: Ventromedial hypothalamus modifies fasted and fed myoelectrical activity of the rat small intestine. In preparation.
- 31.- Epstein, L.B., Rose, M.E., McManus, N.H. and Li, C.H.: Absence of functional and structural homology of natural and recombinant human leukocyte interferon (IFN- $\alpha$ ) with human  $\alpha$ -ACTH and  $\gamma$ -endorphin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 104:341-346, 1982.
- 32.- Friedman, R. M.: Interferon binding: The first step establishment of antiviral activity. *Science*, 156:1760-1761, 1967.
- 33.- Frohman, L.A.: Hypothalamic control of metabolism. In: *Handbook of the Hypothalamus*. Morgane, P.J. and Panksepp, J. (eds). Dekker, New York, 1980, pp. 519-555.
- 34.- Gilman, S.C., Schwartz, J.M. Milner, R.J., Bloom, F.E. and Feldman, J.D.:  $\beta$ -endorphine enhances lymphocyte proliferative responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:4226-4230, 1982.
- 35.- Goldstein, A. and Schulz, R.: Morphine-tolerant longitudinal muscle strips from guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 48:655-666, 1973.
- 36.- Gray, P. W., Leung, D. W., and Pennica, D.: Expression of human immune interferon cDNA en E coli and menkey cells. *Nature*, 295:503-508, 1982.
- 37.- Gresser, I., Maury, C. and Brouty-Boye, D.:N.Mechanism of the antitumor effect of interferon on mice. *Nature*, 239:167-168, 1972.
- 38.- Gresser, I. and Tovey, M. G.: Antitumor effects of interferon. *Biochem. Biophys. Acta*, 516:231-247, 1978.
- 39.- Gresser, I.: Can Interferon induce disease ?. In: *Interferon 4*, Gresser, I. (ed). Acad. Press. Inc. London. 1982, pp. 95-143.

- 40.- Gross, G., Roussaki, A., Ikenberg, H. und Drees, N.: Interferon- $\alpha$  bei condylomata acuminata und juvenilem. Diabetes mellitus. Dtsch. med. Wschr. 11:1351-1355, 1986.
- 41.- Grollman, E. F., Lee, G., Ramos, P. S., Lazo, P. S., Kaback, H. R., Friedman, R. M., and Kohn, L. D.: Relationships of the structure and function of the interferon receptor to hormone receptors and establishment of the antiviral state. Cancer Res., 38:4172-4185, 1978.
- 42.- Gutterman, J. V., Fine, S., Quezada, J., Horming, S. J., Levine, J.F., Alexanian, R., Bernhardt, L., Kramer, M., Spiegel, H., Colburn, W., Trown, P., Mergian, T. and Dziewanoski, A.: Recombinant leukocyte  $\alpha$  interferon: Pharmacokinetics, single-dose tolerance, and biologic effects in cancer patients. Ann. Int. Med. 96:549-556, 1982.
- 43.- Habif, D. V., Lipton, R. and Cantell, K.: Interferon crosses blood-cerebrospinal fluid barrier in monkeys. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149:287-289, 1975.
- 44.- Hazum, E., Chang, K.J. and Cuatrecasas, P.: Specific non-opiate receptors for  $\beta$ -endorphin. Science 205:1033-1035, 1979.
- 45.- Herz, A. and Blasig, J.: Behavioral aspects of precipitated morphine withdrawal in rats. Drug Addiction 3:3-12, 1974.
- 46.- Horning, S.J., Levine, J.F., Miller, R.A., Rosenberg, S.A. and Merigan, T.C.: Clinical and immunologic effects of recombinant leukocyte A interferon in eight patients with advanced cancer. JAMA. 247:1718-1722, 1982.
- 47.- Isaacs, A., K. and Linderman, J.: Virus interference. The interferon. Proc. R. Soc. B. 147:258-267, 1957.
- 48.- Iwarson, S., Novkrans, G., Nordenfelt, E. and Hagberg, R.: Interferon treatment in acute hepatitis B infection with prolonged course. Scand. J. Infect. Dis. 12:233-234, 1980.
- 49.- Jankovic, B.D. and Isakovic, K.: Neuroendocrine correlates of immune response. Part I. Effects of brain lesions on antibody production, Arthus reactivity and delayed hypersensitivity in the rat. Int. Arch. Allergy 65:360-372, 1983.
- 50.- Joshi, A. R., Sarkar, F.H. and Gupta, S.L.: Interferon receptors. Cross-linking of human leukocyte interferon alpha-2 to its receptor on human cells. J. Biol. Chem. 257:13774-13887, 1982.
- 51.- Kirchner, H.: Interferons, a group of multiple lymphokines. Springer. Semin. Immunopathol. 7:347-374, 1984.
- 52.- Krueger, J.M., Dinarello, C.A., Shoham, S., Davenne, D., Walter, J. and Kubillus, S.: Interferon alpha-2 enhances slow-wave sleep in rabbits. Int. J. Immunopharmac. 9:23-30, 1987.

- 40.- Gross, G., Roussaki, A., Ikenberg, H. und Drees, N.: Interferon- $\alpha$  bei condylomata acuminata und juvenilem. Diabetes mellitus. Dtsch. med. Wschr. 11:1351-1355, 1986.
- 41.- Grollman, E. F., Lee, G., Ramos, P. S., Lazo, P. S., Kaback, H. R. Friedman, R. M., and Kohn, L. D.: Relationships of the structure and function of the interferon receptor to hormone receptors and establishment of the antiviral state. Cancer Res., 38:4172-4185, 1978.
- 42.- Gutterman, J. V., Fine, S., Quezada, J., Horming, S. J., Levine, J.F., Alexanian, R., Bernhardt, L., Kramer, M., Spiegel, H., Colburn, W., Trown, P., Mergian, T. and Dziewanoski, A.: Recombinant leukocyte A interferon: Pharmacokinetics, single-dose tolerance, and biologic effects in cancer patients. Ann. Int. Med. 96:549-556, 1982.
- 43.- Habif, D. V., Lipton, R. and Cantell, K.: Interferon crosses blood-cerebrospinal fluid barrier in monkeys. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149:287-289, 1975.
- 44.- Hazum, E., Chang, K.J. and Cuatrecasas, P.: Specific non-opiate receptors for  $\beta$ -endorphin. Science 205:1033-1035, 1979.
- 45.- Herz, A. and Blasig, J.: Behavioral aspects of precipitated morphine withdrawal in rats. Drug Addiction 3:3-12, 1974.
- 46.- Horning, S.J., Levine, J.F., Miller, R.A., Rosenberg, S.A. and Merigan, T.C.: Clinical and immunologic effects of recombinant leukocyte A interferon in eight patients with advanced cancer. JAMA. 247:1718-1722, 1982.
- 47.- Isaacs, A., K. and Linderman, J.: Virus interference. The interferon. Proc. R. Soc. B. 147:258-267, 1957.
- 48.- Iwarson, S., Novkrans, G., Nordenfelt, E. and Hagberg, R.: Interferon treatment in acute hepatitis B infection with prolonged course. Scand. J. Infect. Dis. 12:233-234, 1980.
- 49.- Jankovic, B.D. and Isakovic, K.: Neuroendocrine correlates of immune response. Part I. Effects of brain lesions on antibody production, Arthus reactivity and delayed hypersensitivity in the rat. Int. Arch. Allergy 65:360-372, 1983.
- 50.- Joshi, A. R., Sarkar, F.H. and Gupta, S.L.: Interferon receptors. Cross-linking of human leukocyte interferon alpha-2 to its receptor on human cells. J. Biol. Chem. 257:13774-13887, 1982.
- 51.- Kirchner, H.: Interferons, a group of multiple lymphokines. Springer. Semin. Immunopathol. 7:347-374, 1984.
- 52.- Krueger, J.M., Dinarello, C.A., Shoham, S., Davenne, D., Walter, J. and Kubillus, S.: Interferon alpha-2 enhances slow-wave sleep in rabbits. Int. J. Immunopharmac. 9:23-30, 1987.

- 53.- Littman, S.J., Faltyneck, C.R. and Baglioni, C.: Binding of human recombinant 125I-Interferon gamma to receptors on human cells. *J. Biol. Chem.* 260:1195-1195, 1985.
- 54.- Mains, R.E., Eipper, B.A. and Ling, N.: Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:3014-3018, 1977.
- 55.- Mattson, K., Niiranen, A., Laaksonen, R. and Cantell, K.: Psychometric monitoring of interferon neurotoxicity. *Lancet* 1:275-276, 1984.
- 56.- Meyer, J.: Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. *Physiol. Rev.* 65:947-1020, 1985.
- 57.- Morgane, P. J.: Electrophysiological studies of feeding and satiety centers in the rat. *Ann. J. Physiol.* 201:834-844, 1961.
- 58.- Mowshowitz, S.L., Dawson, G.J. and Elizán, T.S.: Antiviral response of fibroblasts from familial Alzheimer's disease and Down's syndrome to human interferon-alpha. *J. Neural. Transs.* 57:121-126, 1983.
- 59.- Ohno, S. and Taneguchi, T.: Structure of a chromosomal gene for human interferon beta. *Proc. Natl. Sci.* 78:5305-5309, 1981.
- 60.- Oomura, Y.: Input-output organization in the hypothalamus relating to food intake behavior. In: *Handbook of the Hypothalamus.* Morgane, P.J. and Panksepp, J. (eds). Dekker, New York, 1980, pp. 519-555.
- 61.- Paucker, R., Cantell, K. and Henle, W.: Quantitative studies on viral interference in suspended L-cells III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth of cells. *Virology*, 17:324-334, 1962.
- 62.- Paton, W.D.M.: The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 51:119-127, 1977.
- 63.- Pazin, G. H., Armstrong, J. A., Lam, M. T., Tarr, G. C., Jannetta, P. J. and Ho, M.: Prevention of reactivated herpes simplex infection by human leukocyte interferon after operation on the trigeminal root. *New. Engl. J. Med.* 301:225-230, 1979.
- 64.- Pollard, R. B.: Usages of interferon and interferon induces in man. *Med. Biol.* 59:69-76, 1981.
- 65.- Prietsman, T. J.: Initial evaluation of human lymphoblastoid interferons in patients with advanced malignant disease. *Lancet*, 2:113-118, 1980.
- 66.- Prieto-Gómez, B., Reyes-Vázquez, C. and Dafny, N.: Differential effects of interferon on ventromedial hypothalamus and dorsal hippocampus. *J. Neurosci. Res.*, 10:524-529, 1983.

- 67.- Prieto-Gómez, B., Reyes-Vázquez, C. and Dafny, N.: Microiontophoretic application of morphine and naloxone to neurons in hypothalamus of rats. *Neuropharmacol.* 23:1081-1089, 1984.
- 68.- Raff, M. C., Fields, K. L., Hakomori, R., Minsky, R., Pruss, R. M. and Winter, J. Cell-Type specific markers for distinguishing and studying neurons and the mayor classes of glia cells in culture. *Brain Res.*, 174:283-308, 1979.
- 69.- Ratin, M. J., Vardiman, J. W. and Golomb, H. M.: The role of interferon in the treatment of hairy cell leukoming. *Sem. Oncol.* 13:21-28, 1986.
- 70.- Reilly, E. L.: Neuropharmacology and the EEG. *Am. J. EEG. Technol.* 16:99-108, 1976.
- 71.- Reilly, E. L., Fuller, G.N., Wiggins, R. C., Rigor, B. M. and Dafny, N.: Chronic halotane modification of EEG-like activity recorded from somatosensory cortex and deep nuclei in freely behaving rats. *Neurotoxicology*, 2:83-90, 1980.
- 72.- Reyes-Vázquez, C. and Dafny, N.: Response characteristics of thalamic neurons to microiontophoretically applied morphine. *Neuropharmacol.* 21:733-738, 1982.
- 73.- Reyes-Vázquez, C., Prieto-Gómez, B. and Dafny, N.: Novel effects of interferon on the brain: microiontophoretic application and single cell recording in rats. *Neurosci. Lett.* 34:201-206, 1982.
- 74.- Reyes-Vázquez, C. and Dafny, N.: Does Naloxone have functional significant activity on medial thalamic neurons ?. Microiontophoretical study. *Life Sci.* 32:1443-1448, 1983.
- 75.- Reyes-Vázquez, C., Prieto-Gómez, B., Georgiades, J. A. and Dafny, N.: Alpha and gamma interferons effects on cortical and hippocampal neurons: microiontophoretical application and single cell recording. *Intern. J. Neurosci.*, 25:113-121, 1984.
- 76.- Reyes-Vázquez, C. and Dafny, N.: Microiontophoretically applied morphine and naloxone on single cell activity on the parafasciculus nucleus of naive and morphine dependt rats. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 229:583-588, 1984.
- 77.- Reyes-Vázquez, C., Weisbrodt, N. and Dafny, N.: Does interferon exert its actions through opiate receptors ?. *Life Sci.* 35:1015-1021, 1984.
- 78.- Reyes-Vázquez, C. and Georgiades, J. A.: Interferon effects on hypothalamus and its relation with anorexia, in: *The biology of the interferon system.* Stewart, W. E. and Schellekens, H. (eds). Elsevier/North Holland Press, 1987. In Press.

- 79.- Root-Bernstein, R.S.: "Molecular sandwiches" as a bases for structural and functional similarities of interferons, MSH, ACTH, LHRH, myelin basic protein, and albumins. FEBS. 168:208-212, 1984.
- 80.- Roth, S.H.: Physical mechanisms of anesthesia. Annu. Rev. Pharmacol. 19:159-178, 1979.
- 81.- Salerno, R. A., Whitmore, C. A. and Garcia, I. M.: Chemical carcinogenesis in mice inhibited by interferon. Nature, New. Biol. 239:31-32, 1972.
- 82.- Sarna, S., Northcott, P. and Bilbeck, L.: The mechanism of cycling of the migrating myoelectric complexes effect of morphine. Am. J. Physiol. 242:G588-595, 1982.
- 83.- Satoh, M., Zieglgansberger, S. and Herz, A.: Actions of opiates upon single unit activity in the cortex of naive and tolerant rats. Brain Res. 115:99-110, 1976.
- 84.- Scheffè, H.: A method for judging all constast in the analysis of variance. Biometrika 40:87-104, 1974.
- 85.- Scott, G. M., Secher, D. S., Flowers, D., Bate, J., Cantell, K. and Tyrrell, D. A. J.: Toxicity of interferon. Br. Med. J. 282:1345-1348, 1981.
- 86.- Seghal, P.B., May, L.T. and Sagar, A.D.: Multiple human B interferon genes, in DeMaeyer, E. Schellekeus, (eds): The biology of the interferon system, 1983. New York, Elsevier, 1983, pp. 15-20.
- 87.- Shairt, Y., Lewis, J.W., Terman, W.G., Gale, R.P. and Libeskind, J.C.: Opioid peptides mediate the suppressive effect of stress on natural killer cells citotoxicity. Science 223:188-223, 1984.
- 88.- Smedley, H., Katrak, M., Sikora, K. and Wheeler, T.: Neurological effects of recombinant human interferon. Br. Med. J. 286:262-264, 1983.
- 89.- Stein, M., Schiavi, P.C. and Camerino, M.: Influence of brain and behavior on the immune system. Science 191:435-440, 1976.
- 90.- Strauder, H. and Eihorn, S.: Interferon therapy in neoplastic disease. Phil. Trans. R. Soc. B 299:113-117, 1982.
- 91.- Streuli, M., Nagata, S., Weissmann, C.: At least three human type alpha interferons. Structure of alpha2. Science, 209:1343-1347, 1980.
- 92.- Streuli, M., Hall, A. and Ball, W.: Target cell specificity of two species of human interferon alpha produced in Escherichia coli and of hybrid molecules deviced from them. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:2848-2852, 1981.

- 93.- Su, C.Y.: Effects of  $\beta$ -endorphin on narcotic abstinence syndrome in man. *J. Formos. Med. Assoc.* 84:133-141, 1984.
- 94.- Taylor, .C. P. and Dudek, F. E.: Synchronies neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science*, 218:810-812, 1982.
- 95.- Taylor-Papadimitriou, J.: Effects of interferons on cell growth and function in Billian A. (ed): *Interferon I. General and applied aspects.* Amsterdam, Elsevier, 1984, pp. 139-166.
- 96.- Trotta, P. P.: Preclinical biology alpha interferons. *Sem. Oncol.* 13:3-12, 1986.
- 97.- Wei, E.: Quantification of precipitated abstinence in morphine dependent rats. *Fed. Proc.* 31:527-543, 1972.
- 98.- Wybran, J., Appleboom, T., Famaey, J.P. and Govaerts, A.: Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine-enkephalin on normal human blood T lymphocytes. *J. Immunol.* 123:1068-1070, 1979.
- 99.- Zhdanov, V.M. and Yershov, F.I.: The role of interferon in homeostasis. *Contr. Oncol.* 20:25-35, 1984.
- 100.- Zoon, K. C., Zurnedden, D. and Arnheiter, H.: Specific binding of human alpha interferon to a high affinity cell surface binding site on bovine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 257:4695-4697, 1982.