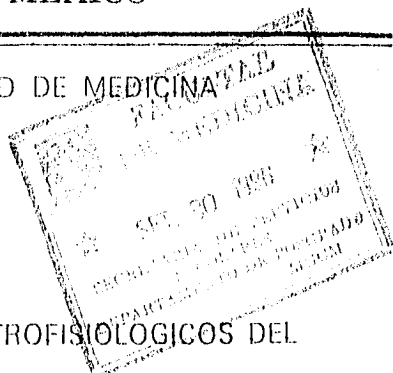


112.6.1
10
29)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA



EFFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS DEL
INTERFERON-ALFA SOBRE LA SINAPSIS DE
NEURONAS DEL HIPOTALAMO LATERAL.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

QFB. VICTOR MENDOZA FERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. EN C. CRUZ REYES VAZQUEZ

CD. UNIVERSITARIA,

SEPTIEMBRE 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION
Subdivisión de Maestrías y Doctorados

Of. No. 058/EJG/MEMR/VI11/96.

DR. MAURICIO FORTES BESPROSVANI
Coordinador General de Estudios
de Posgrado, U.N.A.M.
Presente

At'n: Unidad de Registro e Información.

Informo a usted que el (la) C. VICTOR MENDOZA FERNANDEZ
aspirante al grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIONEDICAS (FISIOLOGIA)
con la tesis titulada "EFECTOS ELECTROFISIOLOGICOS DEL INTERFERON-ALFA SOBRE
LA SINAPSIS DEL HIPOTALAMO LATERAL"

será examinado (a) en el aula de exámenes de grado "Dr. Luis Castelazo Ayala" (Edificio de la Unidad de Posgrado, primer piso, costado sur de la Torre II de Humanidades) por el jurado constituido por los siguientes sinodales:

PRESIDENTE:	DR. ENRIQUE GILJON GRANADOS
SECRETARIO:	DRA. MA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO
PRIMER VOCAL:	DR. CRUZ REYES VAZQUEZ (TUTOR)
SEGUNDO VOCAL:	
TERCER VOCAL:	
SUPLENTE:	DR. FRANCISCO PELLICER GRAHAM
SUPLENTE:	DR. RAFAEL GUTIERREZ AGULLAR

En cumplimiento con los Artículos 18 y 19 del Capítulo I, Título II, del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la U.N.A.M.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, D. F., a30 de agosto de 1996.

Vo. Bo.

DR. HUGO ARECHIGA U.
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado e Investigación

Vo. Bo.

DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA
Director de la Facultad
de Medicina

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo económico brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (No. de reg. 88121), para realizar los estudios de Maestría

El equipo y reactivos empleados fueron adquiridos gracias al apoyo brindado al proyecto de investigación con clave IN205395 del Dr. Cruz Reyes Vázquez. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UNAM.

Dr. Cruz Reyes Vázquez:

De manera muy especial quiero agradecer todo el apoyo incondicional que me has brindado, todas las oportunidades de indagar, evaluar, criticar, crecer y desarrollar dentro de este campo. Admiro tu capacidad para inculcar una formación integral que nos permite discernir entre lo que disfrutamos hacer y lo que se debe hacer, la capacidad de ser independientes y creadores, y el valor para ser portadores de un tipo de ideología personal, el cual puede complementarse con otras que al fin desencadena una serie de ideas que forman el conocimiento. Por otra parte, la visión libre de conducirte como una persona que se encuentra agusto con lo que realiza y es capaz de resolver problemas de una manera clara, fría y acertada. Gracias también por tu amistad y por los pequeños consejos que han determinado grandes situaciones en mi vida.

Máma y Pápa:

Gracias por todo el apoyo que me han brindado, así como por seguir de cerca todo mis propósitos, metas, ilusiones y desencantos. Por la educación y disciplina que me han inculcado con sus actos y por permitirme disfrutar a su lado la vida ... tal como es. Máma: gracias por todo tu esfuerzo, capacidad de trabajo y por la forma en que ves las cosas, lo que hace de ti una persona especial y valiosa. Contigo he aprendido que la vida debe enfrentarse para lograr todas las ilusiones propuestas. Papá: gracias por enseñarme a describir el por qué de las cosas y la forma en que se deben de analizar y esquematizar los problemas que la vida cotidiana nos plantea.

Mónica:

Gracias por tu compañía, por tu ayuda, por tu desición y por tu comprensión que me permiten evaluar y corregir muchos aspectos de mi conducta que al final facilitan la convivencia entre nosotros. Gracias por compartir los sueños y los problemas que nos ayudan a entender el papel en el que estamos involucrados dentro del trabajo y de la familia y sobre todo por tu interés para seguir buscando los mejores logros en nuestras vidas.

Aline Y Víctor:

Gracias por ser la fuente inspiradora de todo lo que realizo y por inyectar esa energía tan característica que tiene ustedes para vivir a largo de un día. La cual permanece durante todo el tiempo que conviven con las personas y se agota hasta muy altas horas de la noche. Por esa tranquilidad y ternura que destilan al dormir para después despertar con las mismas ganas y seguir creciendo. Aunque tengan una edad muy corta ustedes me han enseñado a luchar, aprender y ser inquisitivo. Gracias por ser el alma de la familia.

Dra. Elia B. Naranjo Rodríguez:

Gracias por toda la ayuda incondicional que siempre me ha brindado, la cual es oportuna y está llena de buenas intenciones. Gracias por ser la mejor amiga de la familia y por apoyarme en las decisiones importantes dentro de este campo; así como, por todo los consejos tan atinados que muchas veces me ha regalado.

Gracias a todos los que de una forma u otra han contribuido al desarrollo de mi formación: Anita Mejía P., Filiberto Mendoza H., Miguel Fernández M., Francisco Fernández M., Francisca Fernández M., Martha Díaz, Federico Méndez, Pablo Méndez D., Griselda Méndez D., Maribel Herrera R., Lidia Rangel y Tere Hernández G.

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Representación esquemática del mecanismo de acción de las citocinas	6
2. Modelo representativo de los receptores de membrana para el IFN	11
3. Representación esquemática que muestra la disposición de la cámara de registro (A) y del sistema de circulación (B)	28
4. Diferentes configuraciones para el registro de patch-clamp	34
5. Relación de frecuencia de descarga y tiempo, donde se observa el efecto de inhibición característico del IFN- α sobre las neuronas del HL.	40
6. Efecto de excitación del IFN- α sobre la frecuencia de descarga de las neuronas hipotalámicas	41
7. El IFN- α potencia el efecto de GLUT, lo que se observa en la relación de frecuencia de descarga contra tiempo	44
8. Efecto de potenciación del IFN- α sobre la respuesta a GABA en neuronas del HL.	46
9. Corrientes totales registradas en neuronas hipotalámicas	51
10. Corrientes de calcio registradas después de adicionar tetrodotoxina, CICs y gluconato de Cs	52
11. Reducción de las corrientes de calcio registradas en neuronas hipotalámicas	53
12. Familia de curvas de las corrientes de calcio registradas con diferentes concentraciones de IFN- α .	53
13. Relación corriente-voltaje que muestra los efectos provocados por 1000 UI de IFN- α	54
14. La reducción de las corrientes de calcio por el IFN- α es de larga duración	54

LISTA DE CUADROS

1. Clasificación y propiedades de los IFN	9
2. Tipos de cáncer en los cuales se usa IFN- α .	13
3. Efectos secundarios causados por la terapia con IFN- α	14
4. Funciones reguladas por el HL	18
5. Porcentaje de células que respondieron a la aplicación de IFN- α	41
6. Efecto característico del IFN- α sobre la actividad eléctrica de las neuronas hipotalámicas	42
7. Efecto de inhibición del GLUT sobre la frecuencia de descarga del HL	43
8. Efecto de GABA sobre la frecuencia de descarga de las neuronas hipotalámicas	45
9. La aplicación previa de IFN- α aumenta el porcentaje de respuesta a GLUT	47
10. Porcentaje de respuesta provocado por el GABA después de la aplicación de IFN- α	48
11. Parámetros que muestran el efecto de potenciación del IFN- α sobre GLUT y GABA	49

LISTA DE GRAFICAS

1. Curva de porcentaje de respuesta-concentración para IFN- α	42
2. Comparación de las curvas de porcentaje de respuesta-concentración para GLUT antes y después de la aplicación de IFN- α .	43
3. Comparación de las curvas de porcentaje de respuesta-concentración para GABA antes y después de IFN- α .	45

INDICE

	Página
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
CAPITULO 1. INTRODUCCION.	5
1.1. Características generales de las citokinas	6
1.2. Clasificación y actividades biológicas del Interferon (IFN)	8
1.3. Receptores del IFN y mecanismo de transducción intracelular	10
1.4. Aplicación del IFN- α en la clínica	12
1.5. Presencia y papel fisiológico de las citokinas en el SNC	14
1.6. Interacción del IFN- α con el Hipotálamo lateral (LH)	16
1.7. Efectos electrofisiológicos del IFN- α sobre neuronas del SNC	18
CAPITULO 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	22
2.1. Planteamiento del problema	22
2.2. Hipótesis	26
2.3. Objetivos	26
CAPITULO 3. MATERIALES Y METODOS.	27
3.1. Soluciones de incubación para rebanadas de cerebro	27
3.2. Cámara de Registro	27
3.3. Rebanadas de Cerebro	29
3.4. Sistema de Registro	31
3.5. Protocolo de aplicación de Fármacos	35
3.6. Análisis Estadístico	37
3.7. Fármacos Empleados	38
3.8. Diagrama de flujo que describe la metodología empleada en los presentes experimentos	39
CAPITULO 4. RESULTADOS.	40
4.1. Resultados obtenidos de los registros extracelulares	40
4.2. Resultados obtenidos de los registros de Patch-clamp	49
CAPITULO 5. DISCUSION.	55
CAPITULO 6. CONCLUSIONES.	63
CAPITULO 7. REFERENCIAS.	64

RESUMEN.

Tanto la aplicación sistémica como la microiontoforética de Interferon- α (IFN- α) inducen efectos de larga duración sobre la actividad eléctrica de varios núcleos cerebrales; particularmente, la región hipotalámica lateral (HL) es una de las estructuras que muestra mayor sensibilidad a los efectos de esta citokina. Aunque aún se desconoce su papel fisiológico y la interacción que esta citokina pueda establecer con los neurotransmisores presentes en el HL, además de que aún es necesario esclarecer el mecanismo por el cual, esta sustancia modifica la excitabilidad neuronal. En el presente trabajo se caracterizó el efecto que el IFN- α ejerce sobre la actividad eléctrica extracelular de neuronas del HL, en rebanadas de cerebro de rata. En esta estructura, el IFN- α mostró principalmente cambios en la frecuencia de descarga. El efecto más observado fue una reducción de la actividad eléctrica en el 64.81% de las neuronas registradas; aunque también se observó un aumento en este parámetro por la aplicación de IFN- α al baño de registro (22.23%). Estos efectos del IFN- α modifican la respuesta que las células del HL presentan a neurotransmisores tales como Glutamato y GABA. Así; la adición previa de IFN- α potencia el efecto característico que ambos neurotransmisores ejercen sobre la actividad eléctrica de las neuronas de HL. En la búsqueda de un mecanismo de acción y empleando la técnica de Patch-Clamp configuración célula íntegra, se analizó su efecto sobre el flujo de iones a través de la membrana celular, elemento determinante en la excitabilidad neuronal. El IFN- α reduce ($42.8 \pm 6.8\%$) las corrientes de calcio de estas neuronas sin mostrar efectos significativos en las provocadas por los flujos de iones de sodio o potasio. Aún se desconoce el tipo de canal de calcio es el que se ve afectado. Estos resultados sugieren, que los efectos del IFN- α sobre la excitabilidad neuronal, son el inicio de una serie de eventos los cuales posteriormente se manifestarán en las respuestas conductuales observadas después de la administración de la citokina; tales como los cambios en la ingesta de alimento, el peso y la temperatura corporal.

ABSTRACT.

Both, systemic and microiontophoretic application of α -interferon (α -IFN) exerts long lasting effects on the electrical activity of several brain nuclei; particularly, the lateral hypothalamic area (LH) had shown the highest sensitivity to this cytokine. Although several effects were described related to α -IFN on multiple CNS sites, still we don't know if this cytokine has a physiologic role. As well as, if it has an interaction with other neurotransmitters located in the LH and what is the mechanism used to modify the neuronal excitability. In the present study we analyzed the effects of α -IFN on the electrical activity from rat LH neurons. It was found that the cytokine elicits significant reductions of electrical activity in the 64.81% of the recorded neurons; however an increase in the 22.23% of remainder cells was observed. Furthermore, the effects of this cytokine on the response induced by Glutamate and GABA were recorded. Previous α -IFN addition to the bath, potentiates the characteristic effects of both neurotransmitters on the electrical activity of these neurons. In the search for a mechanism of action and using the patch-clamp technique, the effect of this cytokine on the ionic fluxes through the cellular membrane, main element underlying the cellular excitability, was tested. Alpha-IFN elicited reductions of the calcium currents ($42.8 \pm 6.8\%$, $n=19$), without modifying effects on neither sodium nor potassium currents. Still, the calcium channel involved in such α -IFN action is unknown. The effects of the α -IFN on the electrical activity, are the underlying mechanisms of the behavioral effects induced by this cytokine, such as the modulation of food intake, body weight and central temperature control.

Los resultados del presente trabajo han sido objeto de la siguientes publicaciones formales:

1. XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Efectuado en la ciudad de Mérida, Yucatán. Trabajo presentado: "El IFN- α modula la excitabilidad de las neuronas del Hipotálamo Lateral". 1994.
2. XXXVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Efectuado en la ciudad de Querétaro, Querétaro. Trabajo presentado: "El IFN- α modifica la respuesta al ácido- γ -aminobutírico y al glutamato de las neuronas del Hipotálamo Lateral". 1995.
3. 25th Neuroscience Annual Meeting. Efectuado en la ciudad de San Diego, California USA. Trabajo presentado: "Alpha-IFN modulates the response to GABA and Glutamate on neurons from Lateral Hypothalamus" 1995.
4. Reunion Anual de Estudiantes de Investigación Biomédica y de la Salud. Que se realizará en la Facultad de Medicina. UNAM. México, D.F. Trabajo ha presentar: "El IFN- α regula la actividad eléctrica de del Hipotálamo Lateral a través de la modulación de las corrientes de calcio". Octubre 1996.
5. Reyes-Vázquez, C., **Mendoza-Fernández, V.**, Herrera-Ruiz, M., Dafny, N. Interferon- α modulates glucose sensitive neurons in the hypothalamus. In press. Rev.1996
6. **Mendoza-Fernández, V.**, Herrera-Ruiz, M., Reyes-Vázquez, C. Alpha interferon potentiates the response to glutamate and GABA to hypothalamic neurons in brain slices. In preparation. 1996.

CAPITULO 1. INTRODUCCION.

1.1. Características generales de las citokinas.

El término citokina; empleado por primera vez por Cohen en 1974, es utilizado para designar a cualquier sustancia que se secreta en respuesta a un estímulo inductor y la cual posee la capacidad de modular la actividad de sus células blanco. Las citokinas, a diferencia de las hormonas, se producen en varios tipos celulares; sin embargo, su mecanismo de acción es muy similar, ya que actúan a través de su unión con receptores específicos presentes en la membrana de las células blanco, desencadenando con ello una señal de transducción intracelular (22).

Estas sustancias son mediadores celulares de alto peso molecular (>5000 Da), que ejercen sus efectos de tres formas diferentes: la primera, conocida como autocrina, modula la actividad en la misma célula que la secreta. La segunda es la forma paracrina, en este caso la citokina induce sus efectos al unirse con un receptor presente en una célula adyacente a la que la produjo. Finalmente la forma endocrina, cuando la citokina es liberada al torrente sanguíneo u otros fluidos corporales para interactuar con la célula blanco que posee el receptor (figura 1).

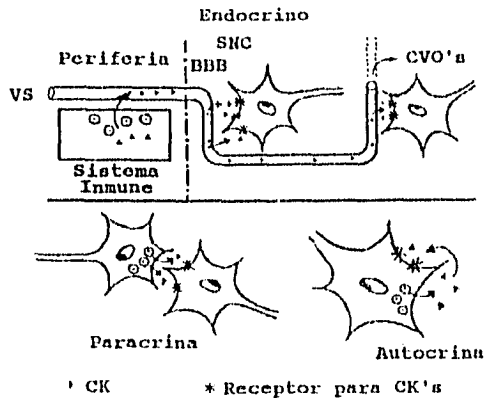


Figura No. 1. Representación esquemática que muestra el modo de acción de las citokinas. CK= citokina, SNC= sistema nervioso central, BBB= barrera hematoencefálica, VS= vasos sanguíneos y CVO's= órganos circunventriculares (78).

La identificación y caracterización de las citokinas permitió clasificarlas en función de sus efectos biológicos. Se conocen actualmente las siguientes citokinas: a) los Factores de Crecimiento (FC); constituidos por una familia de polipéptidos capaces de promover el crecimiento y la división de varios grupos celulares; b) Interleukinas (IL), conjunto de citokinas, producidas por linfocitos que activan a otros grupos celulares e inducen sus efectos biológicos; c) Factores Estimulantes de Colonias (FEC), sustancias involucradas en el crecimiento y diferenciación de linajes específicos de células sanguíneas; d) Factores de Crecimiento Transformante (FCT), citokinas que promueven la diferenciación de ciertas células; e) Factores de Necrosis Tumoral (FNT), polipéptidos que producen regresión de tumores y f) Interferones (IFN), que constituyen un grupo de citokinas con la capacidad de interferir con la replicación intracelular viral y con la proliferación celular (22,91).

Las citokinas forman parte de un sistema orgánico encargado del reconocimiento celular. Entre las funciones de estas sustancias se encuentran: la regulación de las interacciones célula-célula, la distinción entre lo propio y lo no propio y su misión consiste en contrarrestar las influencias nocivas del medio ambiente (bacterias y virus) (1,84). Este sistema posee un importante papel en el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de los organismos, no sólo durante la embriogénesis y el desarrollo neonatal, sino también durante los procesos que se llevan a cabo en la adolescencia y la vida adulta (70,73). Una de las acciones de las citokinas en este proceso consiste en mantener y reparar los órganos y tejidos, así como integrar el control de varias estructuras fisiológicas (59).

Ante la amenaza que representa la capacidad proliferativa de los agentes infecciosos, el Sistema Inmune (SI) reacciona con la producción de niveles relativamente elevados de citokinas. Tal respuesta incrementa la actividad del SI y previene la dispersión de la infección, lo cual provocaría estados patológicos más severos (1). Durante este proceso, la elevación en los niveles de citokinas puede desencadenar varios tipos de efectos en los sitios de infección o inflamación; además al ser liberadas sistémicamente, estas sustancias podrían actuar sobre distintos órganos y tejidos blancos. Por ejemplo, las citokinas contribuyen tanto en los síntomas de la enfermedad, desencadenando fenómenos como fiebre, hipofagia, astenia, etc, como en el proceso patológico mismo, mediante

una respuesta inmunológica exagerada que provoca alteraciones en los tejidos propiamente afectados y en los tejidos vecinos (70,33). Por ello se sugiere que tanto la producción basal como la producción exagerada de citokinas inducida por procesos infecciosos son responsables de la génesis de los signos y síntomas neurológicos de diversas patologías.

1.2. Clasificación y actividades biológicas del Interferon (IFN).

Isaacs y Lindemann describieron la existencia de una sustancia secretada por células infectadas por virus, que puede proteger a otras células sanas de la infección. De esta capacidad para "interferir" con la replicación viral intracelular, deriva su nombre: Interferon (IFN) (51). Además de este efecto, el IFN puede inducir muchos otros cambios en la actividad celular, incluyendo efectos sobre el crecimiento, diferenciación celular, modulación del SI y de ciertas actividades neuronales (63,73,32).

En un principio, la familia del IFN se clasificó con base en su origen, de acuerdo al tipo de células que los producen y a su función dentro del SI, de tal forma que se designaron como IFN leucocitario, IFN fibroblástico e IFN inmune. Posteriormente, se utilizó una clasificación más específica en función de sus propiedades antigénicas. Así, los tres tipos de IFN se clasificaron como: IFN- α , β y γ , respectivamente. Las moléculas de estos compuestos han sido clonadas y secuenciadas. En el caso del IFN- α se han descrito aproximadamente otras 20 proteínas estrechamente relacionadas (52), lo que la convierte en la familia de IFN más numerosa. Recientemente, se describieron dos tipos más de IFN, el ω y el τ que presentan una homología con los IFN's α y β del 70% en su secuencia de aminoácidos (52,1).

Las múltiples especies de IFN que se conocen hasta ahora, han sido incluidas en una clasificación más reciente, fundamentada en la sensibilidad a ciertos ácidos, en su secuencia de aminoácidos, en su relación estructural y en el tipo de receptor que reconocen. Esta clasificación comprende dos tipos principales: el Tipo I donde se encuentran los IFN's ácido estables (IFN- α , β , ω y τ), y el Tipo II en la que se incluye al IFN- γ como único IFN ácido sensible (52), (cuadro 1). Adicionalmente, los IFN del Tipo I son más efectivos para producir

resistencia viral en las células, mientras que el del Tipo II es más importantes en la modulación del SI.

Cuadro No.1. Clasificación y propiedades de los INF.

Interferon	Estructura de a.a.	No. de a.a.	Peso mol. (Da)	Principales Fuentes	Actividad
Tipo I					
IFN- α	Una Cadena	166 -172	16 -27 000	linfocitos	inhiben la proliferación de virus.
IFN- β	Una Cadena	166	20 000	fibroblastos	
IFN- ω	Una Cadena	160-180	16 -28 000	linfocitos	
IFN- τ	Una Cadena	160-170	14 -26 000	linfocitos	
Tipo II					
IFN- γ	Dímero	143	50 000	Células NK linfocitos T	promueve actividad del sistema inmuna

a.a. = aminoácidos, células NK= asesinas naturales (Natural Killer) (52,32).

Los IFN del Tipo I, se unen a un mismo receptor, que se encuentra ampliamente distribuido sobre la membrana de diferentes tipos celulares dentro del SI y en células del Sistema Nervioso Central (SNC) (10,18,91). Por otra parte, el IFN- γ posee un receptor distinto con un patrón de distribución más reducido, el cual se encuentra asociado a una cadena larga de carbohidratos en su parte extracelular (10,56,60).

La producción del INF- α , se inicia por un estímulo reconocido por ciertos receptores localizados en la membrana de las diferentes células productoras de esta citokina (células del SI, astrocitos, glia y neuronas) (90). Este estímulo puede ser de diversa naturaleza y origen, entre estos se encuentran: otras citokinas (IL-1,IL-6,FNT,etc), algunas hormonas (corticoesteroides, glucocorticoides), además de antígenos, mitogénos y moléculas efectoras (lipopolisacáridos), virus y algunas bacterias intracelulares (4,61,94).

A nivel intracelular, las señales que regulan la síntesis del INF- α implican la activación de la kinasa de la tirosina y el aumento en la concentración intracelular de calcio (Ca^{2+}) (1). Una vez inducida esta

señal, se activan diversos mecanismos que involucran a diferentes proteínas reguladoras de la transcripción genética para la síntesis de INF- α (94). Posteriormente, la citokina es secretada por un sistema de transporte que incluye al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi (77). Durante todo este proceso, el INF- α sufre modificaciones químicas post-transcripcionales como la glicosilación y disminución en el número de aminoácidos, lo que le confiere su actividad fisiológica y modula la unión a sus receptores (30).

En lo particular, el INF- α produce un amplio rango de efectos biológicos. Los más estudiados son: a) su actividad anti-viral, que es una característica utilizada para definir las unidades internacionales (UI) de esta citokina (75); b) su actividad estimulante sobre las propiedades citotóxicas de linfocitos, células NK y macrófagos (69,76) y c) su acción sobre la expresión de algunos antígenos asociados a tumores (45,46). Además, el INF- α modula la diferenciación de varios tipos celulares y presenta actividad antiproliferativa (38,47). Un posible papel fisiológico de tales efectos puede ser limitar la proliferación celular por medio de una retroinformación autocrina o paracrina, contrarrestando las acciones de los factores de crecimiento sobre la división celular (37).

1.3. Receptores para el IFN y mecanismo de transducción intracelular.

El receptor para el IFN- α está constituido por una glicoproteína de 130 KDa, integrada en la membrana plasmática de las células blanco y que consta de tres diferentes dominios. El primero es el dominio de reconocimiento localizado en la parte extracelular de la membrana plasmática y el cual le confiere la especificidad para la unión del IFN- α . Esta región se encuentra altamente glicosilada y contiene además varios azúcares ligados covalentemente y cadenas de oligosacáridos, los cuales pueden estar involucrados en la conformación del sitio de unión en el receptor. El segundo dominio es una región de naturaleza altamente hidrofóbica que se extiende dentro de la porción externa e interna de la membrana plasmática. La función de este dominio es anclar al receptor a la membrana.

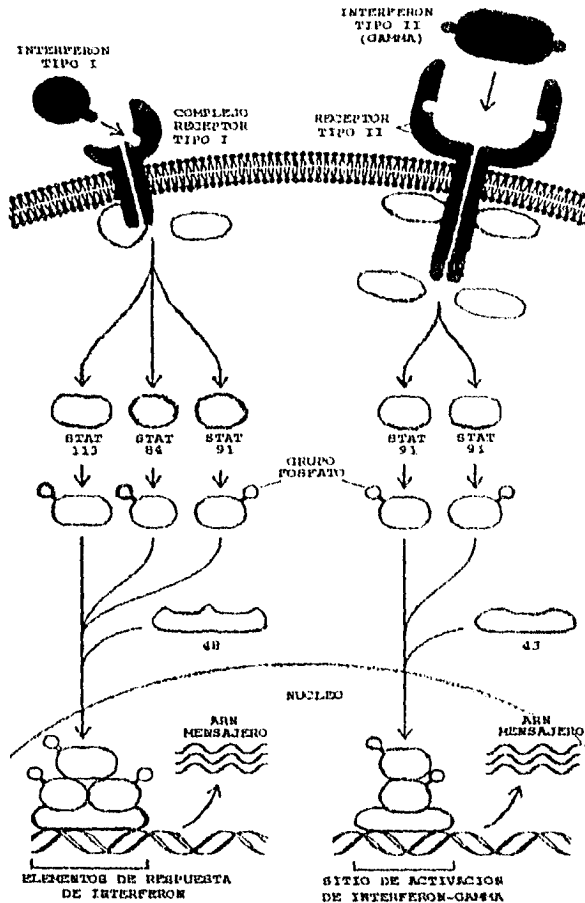


Figura No. 2. Modelo representativo de los receptores de membrana y el mecanismo de transducción intracelular que los IFN utilizan para ejercer sus efectos inmunológicos (52).

Finalmente, el tercer dominio esta localizado sobre la superficie interna de la membrana y funciona como un dispositivo de señalamiento para otras moléculas localizadas en su vecindad (25). Este dominio se

encuentra asociado a enzimas, del tipo de las kinasas de la tirosina, las cuales son capaces de fosforilar residuos de tirosina presentes en ella misma y en otras proteínas que se encuentran cercanamente asociadas (52).

Los INF del Tipo I (IFN- α , β , τ y ω) una vez unidos al receptor, inducen la activación de dos enzimas, la kinasa de la tirosina 2 (Tyk2), unida al dominio intracelular del receptor y la Janus Kinasa 1 (JAK1) que adiciona dos grupos fosfato (Pi) a residuos de tirosina. Ambas enzimas fosforilan a tres diferentes proteínas conocidas como Stat (Signal transducers) de 113, 91 y 84 kDa respectivamente. La fosforilación de las tirosinas induce su asociación con una nueva proteína de 48 kDa. El complejo resultante se une a ciertos genes dentro del núcleo, lo cual induce la respuesta inmunológica (52,74). Por su parte el IFN- γ al unirse a un receptor distinto de 90 kDa, activa dos enzimas janus kinasas (JAK1 y JAK2), que fosforilan a dos proteínas Stat de 91 kDa cada una, tal fosforilación induce la respuesta (Figura 2).

Aún desconocemos la relación entre el nivel de ocupación del receptor y la respuesta celular producida; por lo que no es posible explicar fenómenos tipo "todo o nada" en la respuesta de las células al IFN.

1.4. Aplicación del IFN- α en la clínica.

La actividad anti-viral y anti-proliferativa del IFN- α in vitro sugirió su uso potencial como agente terapéutico y profiláctico en un gran número de enfermedades de tipo hematológico, oncológico y viral. Por ello, en la década de los 70's, se consideró a esta citokina como la panacea de muchas de estas enfermedades. Sin embargo el INF- α produce en muy pocos padecimientos efectos benéficos duraderos. La respuesta que se observa después de su aplicación es muy variada y complicada; a pesar de ello el INF- α constituye un tratamiento de elección en algunas enfermedades humanas (13,19,39,61,38).

El IFN- α tiene poca efectividad contra los cánceres comunes, tales como los de pulmón, mama y colorectal, los cuales constituyen la principal causa de muerte en hombres y mujeres (44). Sólo algunos pacientes con este tipo de cáncer responden satisfactoriamente al tratamiento,

mientras que la gran mayoría de los tumores sólidos requieren de una terapia combinada con otras citokinas (IL-1,IL-2,TNF- α ,etc.) (71) (cuadro 2).

Cuadro No. 2.Tipo de cáncer en los que la terapia con IFN- α es frecuentemente exitosa.

Tumor	Citokinas combinadas para su tratamiento
Hematológicos	
Leucemia de células tálciformes	IFN- α , IL-2
Linfoma no Hodgkin (bajo grado)	IFN- α , FNT- α
Linfoma cutáneo de células T	IFN- α , IL-1 β ,
Leucemia crónica linfocítica (crisis pre-blástica)	IFN- α , FNT- α
Tumores sólidos	
Melanoma maligno	FNT- α , FNT- β , IFN- α
Carcinoma celular renal	FNT- α , IFN- α
Sarcoma de Kaposi (relacionado al SIDA)	IFN- α
Tumor carcinoide	FNT- β , IFN- α , IL-1 α y β
Cáncer ovárico	FNT- α , IFN- α
Cáncer de vejiga	IL-10, IL-11, FNT- α
Tumores de cabeza y nuca (escamosos)	FNT- β , IFN- α
Cáncer nasofaríngeo	FNT- α , FNT- β , IFN- α
Cáncer cervical (tracto genital bajo)	IL-4, IL-3, IFN- α

Las dosis de IFN- α usadas para el tratamiento de estos tipos de cáncer se encuentran dentro del rango de uno hasta 30 millones de UI (una UI equivale a la cantidad necesaria de IFN- α para proteger al 50% de células de una citopatología viral) (1). Las unidades de IFN- α contenidas en un mg de proteína de esta citokina varían conforme a su proceso de obtención y purificación, por lo general un mg de proteína de IFN- α contiene 2.5×10^8 UI (98,99).

El principal efecto secundario del tratamiento con esta citokina, es el "complejo de reacción febril". Este cuadro incluye fiebre, dolor de cabeza, malestar general, etc., y se acompaña de una disminución de las funciones de la médula ósea, del hígado y riñones (92,93). También se presentan alteraciones neurológicas importantes, durante todo el tiempo de su administración, que desaparecen cuando se retira el tratamiento (92), e incluyen: alteraciones de la conducta, del patrón de sueño, fiebre,

fatiga, anorexia, vértigos, pérdida de conciencia, alteraciones afectivas y depresión del SNC (3,28,36) (cuadro 3).

Cuadro No. 3. Efectos secundarios causados por la terapia con IFN- α .

Efecto clínico observado

Fiebre

Calosfríos

Adinamia

Astenia

Dolor de cabeza

Fatiga

Anorexia

Pérdida de peso

Cambios en el EEG

Confusión

Estados mentales alterados

Toxicidad farmacológica

Hígado (cambios histopatológicos)

Riñones (proteinuria, glomerulonefritis)

Inhibición de la hematopoyesis

Disturbios cardiacos (arritmias, isquemias)

Respuesta inmunológica

Disminución de la actividad de células NK

Inducción de anticuerpos.

Inicialmente, se pensó que tales efectos adversos resultaban de las impurezas de las preparaciones que contenían a esta citokina; sin embargo, aún después de contar con una pureza mayor al 95%, estos efectos adversos continuaron, lo cual indicó que son consecuencia de la acción propia de la proteína de IFN- α .

1.5. Presencia y papel fisiológico de las citokinas dentro del SNC.

Durante procesos patológicos de tipo infeccioso y en pacientes bajo terapia con IFN- α , se evidenció la presencia de citokinas dentro del SNC (10, 39). Este hallazgo, aunado a la inmunosupresión observada en sujetos sometidos a estrés, inició una serie de experimentos encaminados a determinar el origen de tales compuestos. Los resultados de estos estudios mostraron que el SNC, mediante la producción de neurotransmisores, regula de manera específica las funciones del SI. Por

su parte, el SI puede a su vez tener acciones neuromoduladoras mediante la producción de citokinas (78). Esta situación estableció la existencia de una comunicación bidireccional entre ambos sistemas.

La presencia de las citokinas en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) es el resultado de una síntesis local y de su captura de la circulación periférica. Existen varios tipos de células cerebrales con capacidad de sintetizar y liberar citokinas dentro del SNC; éstas incluyen a los macrófagos (53), los linfocitos T activados que cruzan la barrera hematoencefálica (96), las células endoteliales de la vasculatura cerebral (14), la microglia de origen monocítico (43), los astrocitos (40,41) las neuronas motoras y noradrenérgicas (18).

La captura de citokinas de la circulación periférica se realiza por medio de un sistema de transporte regulado bidireccionalmente en la barrera hematoencefálica (8). Las citokinas liberadas en la periferia tienen un acceso lento al líquido intersticial del cerebro a través de los órganos circunventriculares (órgano subfornical, órgano vasculoso de la lámina terminal, eminencia media, el lóbulo intermedio y el lóbulo neural de la pituitaria, órgano subcomisural, glándula pineal y área postrema) (17). Además, por un sistema de transporte selectivo pueden alcanzar otros sitios cerebrales o al LCR ventricular (72). Recientemente se mostró que los plexos coroideos, representan un sistema de transporte rápido de péptidos hacia el cerebro (97). Estas estructuras tienen una alta concentración de receptores para citokinas (35) y una alta capacidad para capturar las citokinas presentes en el LCR. Otra fuente para la captura de citokinas la constituyen las células cebadas localizadas en los vasos sanguíneos de la barrera hematoencefálica (en tálamo, hipocampo, ventrículos laterales y tercer ventrículo). Estas células pueden liberar sus mediadores durante la inflamación y con ello incrementar la permeabilidad de los vasos sanguíneos de la barrera hematoencefálica a las citokinas (68).

Las principales citokinas presentes en el SNC son: la IL-1 (14,60), IL-2 (10), IL-3 (46), IL-6 (64,66,82,95), el TNF- α (42), el TGF- α (23) e IFN- α y - γ (2,56,60,61). Mediante el uso de técnicas histoquímicas y de fluorescencia se mostró la existencia de receptores de membrana específicos para estas citokinas (18,35,49,56). Aunque el patrón de

distribución es amplio, se observó la coexistencia de estas sustancias con neuronas noradrenérgicas (18). Los principales sitios en los cuales los receptores están presentes son: el hipotálamo, el hipocampo, la corteza y el tallo cerebral (49,56,60). El papel fisiológico de estas citokinas dentro del SNC no se conoce completamente. Sin embargo, se sugiere su participación en procesos de crecimiento (82), diferenciación (63,73), proliferación (10) y reparación de tejidos nerviosos (90). Además, las citokinas participan en la mediación de las respuestas inmunológicas, endócrinas, metabólicas y neurológicas; las cuales inducen las manifestaciones clínicas de ciertos cuadros patológicos (31).

1.6. Interacción del IFN- α con el hipotálamo lateral (HL).

Tanto los efectos colaterales observados durante la terapia con IFN- α como las manifestaciones clínicas presentes en sujetos con infecciones, sugieren una acción del IFN- α sobre centros sensoriales y del sistema límbico. Un centro de integración que está relacionado con tales funciones es el hipotálamo. Además, se han descrito receptores para IFN- α , IL-6 e IL-1 en esta estructura y se mostró que el IFN- α ejerce un efecto anoréxico por una acción dentro del HL y el hipotálamo ventromedial (HVM) (79,87). Sin embargo se desconoce el sitio exacto así como el mecanismo de acción que utiliza esta citokina para inducir tales efectos.

Es posible que la acción del IFN- α dependa de su interacción con alguno de los múltiples neurotransmisores que ahí se localizan tales como: dopamina, noradrenalina, acetilcolina, serotonina (5-hidroxitriptamina), histamina, ácido-gamma-aminobutírico (GABA), glutamato (GLUT), glicina, β -endorfinas (derivados de la proopiomelanocortina), colecistokinina, neurotensina, glucagón y galanina (24).

Por otro lado, aunque las células que componen al HL presentan una distribución en grupos celulares con diversas relaciones estructurales, tamaños y densidades, una de sus características es su capacidad para responder a ciertos componentes del plasma, como la concentración de glucosa y de varias hormonas (insulina, glucagón, somatostatina), así como a la temperatura y presión osmótica (11). Esta peculiaridad se suma a su capacidad para responder a la información procedente de otros sistemas

neuronales (7). Debido a ello, el HL responde a una gran variedad de aferencias, que conducen estímulos exteroceptivos (dolor, temperatura, visión, etc), interoceptivos (distensión e isquemia visceral), cambios emocionales y expresiones conductuales (hambre, combate, sed, huida y coito) e influye para mantener un medio interior corporal constante (homeostasis) (9,54). Esta diversidad de acciones podría explicar la gama tan amplia de efectos neuronales provocados por la presencia del IFN- α en el HL.

Desde un punto de vista neuroquímico la información que recibe el HL proveniente del tallo cerebral, se ejerce a través del principal neurotransmisor presente en esta zona, la noradrenalina (NA). Esta sustancia se libera dentro del HL y actúa sobre receptores α y β , involucrados en el control de varias funciones como la ingesta de alimentos (58), el control de la presión sanguínea y en la frecuencia cardíaca (21). La NA es además un modulador importante de la respuesta que presentan las células del HL a otros neurotransmisores presentes en el SNC ya sean de tipo excitador o inhibitorio (11). También la 5-hidroxitriptamina (5-HT) y la glicina actúan como neurotransmisores para proveer de información bulbar útil en la inhibición nociceptiva (7).

El HL posee conexiones con la corteza cerebral, particularmente con la prefrontal, la cual se encarga de discriminar los estímulos sensoriales, tal relación funcional se encuentra sujeta al estado motivacional y emocional del organismo; el neurotransmisor involucrado en estas conexiones es la dopamina (9). Sus aferencias con la amígdala y el hipocampo, se realizan vía la *stria terminalis*. Estas aferencias son fundamentales para regular funciones cooperativas necesarias para que el HL discrimine entre los diversos estímulos esenciales para la ingesta de alimentos y conductas motivacionales (11). Por último, existen aferencias entre el HL y otros núcleos hipotalámicos, las cuales regulan funciones como el control visceral y el neuroendócrino, además de la integración de las respuestas metabólicas (54).

La participación del HL en el control del peso corporal es fundamental, por lo que se le consideró como el "centro del hambre" (5). La destrucción del HL induce una marcada anorexia (11), la cual genera un estado caquéctico, similar al que resulta de la aplicación hipotalámica de

citokinas del tipo de FNT- α , IL-2, IL-6 e IFN- α (80,79,87). Estas sustancias inducen cambios sobre la sensibilidad de las neuronas del HL a compuestos tales como glucosa, insulina, glucagon, carbohidratos y proteínas, lo cual provoca un desequilibrio metabólico (11) (cuadro 4).

Cuadro No. 4. Funciones reguladas por el HL.

Función	Aferencia
Regulación de la temperatura	Receptores para el frío y calor células termo-sensibles en HL.
Ingesta de líquidos "sed"	Osmorreceptores presentes en células del HL.
Ingesta de alimentos "Hambre"	Células glucoso-sensibles del HL.
Reacciones defensivas (temor, cólera)	Sistema límbico.
Regulación del peso corporal	Células glucoso-sensibles dentro del HL y que responden a niveles de insulina.
Regulación del metabolismo intermedio Gluconeogénesis, lipólisis, lipogénesis y de las enzimas involucradas.	Células sensibles a los niveles plasmáticos de glucosa, insulina, carbohidratos, proteínas, fosfolípidos.

1.7. Efectos electrofisiológicos del IFN- α sobre neuronas del SNC.

El INF- α provoca importantes efectos electrofisiológicos neuronales. Por ejemplo, Calvet y Gresser en 1979 mostrarán que el INF- α induce un aumento en la frecuencia de descarga espontánea y provocada en neuronas de la corteza cerebral y cerebelar. Este efecto mostró una latencia corta y un incremento en el número de eventos de descarga en trenes (burst), sin presentar efectos sobre la amplitud de los potenciales de acción (20).

La aplicación microiontoforética de INF- α sobre células de la corteza cerebral y del tálamo medio, provocó un aumento en la frecuencia de descarga en las neuronas de la corteza, el cual fue dependiente de la concentración de IFN- α utilizada. Esta citokina sólo induce sus efectos de

manera específica sobre ciertos grupos neuronales. Por ejemplo, algunas estructuras cerebrales como las del tálamo medio, se muestran insensibles a la aplicación del IFN- α (85).

La aplicación microiontóforética de IFN- α (1×10^6 UI/ml) en el hipocampo dorsal, induce un incremento de larga duración en la actividad eléctrica de las neuronas, mientras que en las neuronas del hipotálamo se observó una respuesta mixta a las diferentes concentraciones aplicadas (81). Es decir, algunas respondieron con un incremento y otras con una disminución en la frecuencia de descarga. En este experimento las concentraciones más altas de IFN- α provocaron cambios en la amplitud del potencial de acción registrado intracelularmente. Adicionalmente, cuando se aplicó por microiontóforesis el IFN- α y el IFN- γ sobre neuronas de corteza cerebral e hipocampo, se encontró que el primero provocó incrementos en la frecuencia de descarga eléctrica de forma dependiente de la concentración. Sin embargo, el IFN- γ no indujo cambio visible alguno sobre estas estructuras (86). Esta selectividad en los efectos del IFN- α fue además sustentada por estudios conductuales y electrofisiológicos (29).

Para tratar de explicar el posible mecanismo de acción por el cual el IFN- α ejercía estos efectos dentro del SNC, se propuso en base a la estructura química de esta citokina una relación con derivados de la proopiomelanocortina (15). Lo que sugería entonces una relación del IFN- α con receptores opiodes, para analizar este hecho, desde un punto de vista conductual, se mostró que la aplicación intracerebral de IFN- α en ratones, produce efectos similares a los provocados por la aplicación de morfina, estos son: inducción de analgesia, disminución de la actividad locomotriz y catatonía; efectos que fueron antagonizados por la aplicación de naloxona (16).

Además, estudios realizados *in vitro* mostraron que el IFN- α es capaz de desplazar a la morfina tritiada, lo que sugiere una unión a receptores opiodes, este efecto también fue bloqueado por la presencia de naloxona (6,16). Adicionalmente, se mostró que la administración de IFN- α en ratas dependientes a morfina, reduce y modifica el síndrome de abstinencia a la morfina desencadenado por la aplicación de naloxona

(27,83).

La participación de los receptores opioides en los efectos provocados por el IFN- α fue evaluada por la técnica clásica de la estimulación in vitro de íleo de cobayo. Los resultados mostraron que la aplicación de INF- α , incrementó el tamaño de las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica. Este efecto es el opuesto al provocado por opioides y no fue bloqueado por la adición de naloxona. Lo que sugiere que los efectos del INF- α sobre la actividad eléctrica de las neuronas no se realizan a través su unión con receptores opioides (89).

Con el empleo de una técnica de electroencefalograma (EEG), se mostró que la administración intraperitoneal de INF- α induce cambios en la actividad eléctrica en la mayoría de las estructuras nerviosas. El principal efecto fue un incremento en el voltaje y en la actividad eléctrica en todas las derivaciones, sobre todo en el hipocampo y en la corteza sensorial. El efecto persistió hasta 72 hrs después de la aplicación única de esta citokina (26). En el mismo estudio se utilizó la aplicación microiontóforética de INF- α , morfina y naloxona. Se observó que la citokina aumenta la actividad espontánea de las neuronas de la corteza, mientras que la morfina provocó el efecto opuesto. Sólo la acción de la morfina se mostró sensible a la aplicación previa de naloxona. Estos resultados descartan la posibilidad de la participación de los receptores opioides en los efectos electrofisiológicos desencadenados por el INF- α (86).

Sin embargo, la controversia sobre la participación de receptores opioides en la respuesta al IFN- α , aún existe. Así, se mostró que dentro del hipotálamo el INF- α también provoca cambios en la actividad eléctrica del área preóptica del hipotálamo anterior (HA) y del HVM en rebanadas de cerebro de rata. En el área del HA el 76% de las neuronas registradas presenta tanto incrementos como disminuciones en la frecuencia de descarga. Por otra parte dentro del HVM, el INF- α siempre aumentó la frecuencia de descarga, la aplicación de naloxona antagonizó el efecto inhibitor del INF- α en el área del HA y el efecto excitador en el HVM.

Los efectos del IFN- α en estas regiones se presentan en células

identificadas funcionalmente. Por ejemplo, en neuronas que muestran cambios en su actividad eléctrica por variación de la temperatura del medio. En ellas, el $\text{INF-}\alpha$ produjo una disminución en la actividad eléctrica de neuronas sensibles al calor e incrementos en neuronas sensibles al frío (67). De manera similar esta citokina modifica la excitabilidad eléctrica de neuronas del HVM que responden a los cambios de glucosa del medio (84). Además en HL el $\text{INF-}\alpha$ provoca incrementos de la excitabilidad sólo en células que responden a cambios en la concentración de glucosa del medio, mientras que no muestran efectos en neuronas insensibles a este parámetro (84). Los efectos de esta citokina en HL persisten durante varios minutos.

Por su parte, los efectos del $\text{INF-}\alpha$ sobre la ingesta de alimento son reproducibles en modelos animales en los que se emplean técnicas de microinfusión intracerebroventricular y aplicación sistémica de esta citokina. Su administración induce una hipofagia reversible de gran intensidad y duración, una disminución en la cantidad de comida y en la duración de esta actividad. Por lo que respecta a la actividad eléctrica de las áreas del HL registradas, éstas presentan incrementos en la frecuencia de descarga, particularmente en las neuronas sensibles a los cambios en la concentración de glucosa del medio (50,87).

CAPITULO 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

2.1. Planteamiento del problema.

Tanto la inmunosupresión que presentan los sujetos que se encuentran bajo condiciones de estrés (88), como los efectos colaterales observados durante la terapia con IFN- α (alteraciones de conducta, sueño, fiebre, fatiga, anorexia, vértigo, adinamia, astenia, dolor de cabeza, etc.) (93) sugieren una comunicación recíproca entre el SI y el SNC. Por las características de estos efectos, es posible que el IFN- α mantenga una interacción directa con neuronas de centros sensoriales y motores así como del sistema límbico (65).

Estos efectos conductuales probablemente sean consecuencia de una alteración de la excitabilidad celular provocada por el IFN- α sobre neuronas de diferentes estructuras del SNC (HVM, HA, HL, hipocampo y corteza). Estos efectos son selectivos ya que, ni otras estructuras responden a la aplicación de esta misma sustancia, ni otros tipos de IFN modifican la excitabilidad celular.

Los principales efectos provocados por el IFN- α sobre la excitabilidad neuronal, se relacionan con aumentos en la frecuencia de descarga espontánea, disminución en la amplitud y morfología de los potenciales de acción de las neuronas sensibles a esta citokina. Estos efectos muestran una relación dependiente con la concentración de IFN- α aplicada y sugieren una interacción de esta citokina con la membrana celular la cual modifica las propiedades eléctricas neuronales.

Los efectos que provoca el IFN- α se presentan en células caracterizadas funcionalmente; es decir, sólo en células que responden con cambios en su actividad eléctrica por variaciones de la temperatura corporal o en la concentración sérica de glucosa. Conductualmente los efectos del IFN- α se relacionan con actividades tales como la ingesta de alimentos y la regulación de la temperatura. Estos datos hacen factible que los efectos del IFN- α sobre la actividad eléctrica sean el mecanismo subyacente a sus acciones conductuales observadas.

A pesar de la descripción de los múltiples efectos conductuales y electrofisiológicos provocados por la administración del IFN- α , su mecanismo de acción a nivel celular no ha sido aún descrito. Los efectos que esta citokina ejerce a nivel inmunológico involucra mecanismos a largo plazo que tardan horas en manifestarse, lo cual es el resultado de una acción genómica (52); mientras que sus efectos sobre la frecuencia de descarga celular, se presentan en cuestión de segundos, adicionalmente, la activación de los receptores al IFN- α desencadena fundamentalmente cambios en la maquinaria genética sin que se hayan descrito aún cambios en el flujo transmembranal de iones. Lo cual es requisito para modificar la excitabilidad celular. Por otra parte, los efectos mediados por este receptor son específicos de especie (6), mientras que las acciones electrofisiológicas no lo son (16). Estos datos denotan la posibilidad de la activación de dos mecanismos de acción a nivel de membrana celular totalmente diferentes los cuales no involucran al mismo receptor.

Los resultados provenientes de los estudios electrofisiológicos sugieren una interacción entre el IFN- α y la membrana celular, la cual modifica posiblemente el flujo transmembranal de iones y por ende la excitabilidad celular, esta acción desencadena los cambios en la frecuencia de descarga descritos para esta citokina. Es probable que esta interacción sea, sino específica, si selectiva, puesto que sólo se presenta en algunas estructuras y en una forma diferente en cada una de ellas. Además estas respuestas eléctricas sólo se producen en presencia de IFN- α y no de IFN- β o IFN- γ (86). También desconocemos si la interacción entre el IFN- α y la membrana celular modifica la respuesta, hacia otros neurotransmisores a los que estas neuronas son sensibles. Esta información es importante por que permitiría determinar una acción neuromoduladora de esta citokina dentro del SNC.

Por otro lado, analizando las acciones que el IFN- α ejerce sobre el desarrollo y la diferenciación celular (47,77) las cuales, incidentalmente, podrían ser el resultado de una interacción con el flujo transmembranal de iones, implican que esta citokina podría actuar también como una neurotrofina. Estas sustancias constituyen un conjunto de péptidos los cuales regulan los procesos celulares determinantes del crecimiento y diferenciación. Su mecanismo de acción se realiza por medio de la

regulación de la concentración intracelular de calcio (Ca^{2+}), lo que incluye efectos sobre el flujo transmembranal de este ión (73). Una acción de esta índole puede desencadenar cambios inmediatos sobre la excitabilidad celular y como consecuencia también sobre la frecuencia de descarga y otras propiedades eléctricas de las neuronas (59).

El presente estudio describe el efecto que el IFN- α ejerce sobre la frecuencia de descarga de las neuronas del HL. Además, analiza los efectos de esta citokina sobre las respuestas que presentan estas neuronas hacia dos neurotransmisores ampliamente distribuidos dentro del SNC como son GLUT y GABA. El efecto de ambos neurotransmisores, está ampliamente caracterizado y a diferencia de otros, su acción es reproducible y constante a lo largo de todo el SNC. Además, estos neurotransmisores están involucrados en la modulación de un gran número de acciones fisiológicas (24). Por otro lado, utilizando registros de fijación de voltaje en porciones de membrana (Patch-Clamp) determinamos el efecto que el IFN- α ejerce sobre las corrientes de calcio en neuronas hipotalámicas. Estas corrientes constituyen el principal índice del flujo de Ca^{2+} a través de la membrana celular. Tomando como base que el IFN- α puede tener un mecanismo de acción similar al que presentan las neurotrofinas, para regular los procesos de crecimiento y diferenciación neuronal. De tal forma que posiblemente esta citokina module la concentración intracelular de Ca^{2+} , al modificar la actividad de los canales responsables de su flujo.

Los canales de calcio dependientes de voltaje, se agrupan en dos tipos: los canales HVA (canales activados por voltajes altos) y los LVA (canales activados por voltajes bajos). La apertura de estos canales, la cual depende del nivel de potencial de membrana, provoca un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} libre, lo que desencadena una cascada de eventos bioquímicos que culminan en la modificación de la actividad celular (62).

El Ca^{2+} , considerado como el principal mensajero intracelular (62), constituye uno de los mecanismos más importantes para modular las funciones, el desarrollo y la diferenciación celular. Muchos factores hormonales y de crecimiento modifican estas actividades a través de modular la entrada de este ión a la célula, mediante el control de los

canales de calcio HVA (12).

Con base en estas consideraciones resulta congruente sugerir que el sitio blanco para las acciones del IFN- α lo constituyen receptores que se encuentran a nivel de membrana, diferentes a los que median sus efectos inmunológicos (52). Gracias a estos receptores el IFN- α podría también modular el papel fisiológico que ejercen algunos de los neurotransmisores involucrados en la actividad del HL, con lo cual modificaría la excitabilidad membranal y con ello la respuesta celular. El posible receptor involucrado, podría además encontrarse acoplado a un tipo de señal intracelular que modifique algunas de las características de algún tipo de canal de Ca^{2+} presente en las neuronas del HL. Esta información sería fundamental para determinar el papel fisiológico que como un neuromodulador llevaría a cabo el IFN- α .

2.2. Hipótesis.

- 1.- El IFN- α modulala actividad eléctrica de las neuronas del HL actuando selectivamente en la sinapsis.
- 2.-El IFN- α modifica la respuesta neuronal del HL al GLUT y al GABA, lo que podrá ser medido directamente con una interacción farmacológica que implique la determinación de la CE_{50} , en presencia y ausencia de IFN- α
- 4.- Los efectos del IFN- α sobre las propiedades eléctricas de la membrana celular, son provocados por la modificación de las corrientes de Ca^{2+} registradas en las células del HL.

2.3. Objetivos.

- Caracterizar el efecto del IFN- α sobre la actividad eléctrica de las neuronas del HL en rebanadas de cerebro de rata. Para ello se realizará la aplicación local de la citokina y el registro extracelular de las neuronas.
- Describir el efecto provocado por el INF- α sobre las respuestas inducidas por dos neurotransmisores en las neuronas del HL, como son GLUT y GABA.
- Describir el efecto del INF- α sobre las corriente de Ca^{2+} en registros de Patch-Clamp configuración de célula íntegra.

CAPITULO 3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Soluciones de incubación para las rebanas de cerebro.

3.1.1. Líquido Cefalorraquídeo Artificial (LCRA).

Para los registros extracelulares se utilizó una solución de LCRA, que se preparaba el día anterior al registro. Tal solución debía tener una osmolaridad de 300 mOsm y un pH de 7.40. Con la siguiente composición en mM: 124.0 de NaCl, 5.5 de KCl, 1.25 de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.0 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 26.0 de Na_2HCO_3 y 10.0 de glucosa. Esta solución es oxigenada constantemente durante los registros con una mezcla de O_2 al 95% y CO_2 al 5%. La temperatura durante el experimento fue de $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (55).

3.1.2. Soluciones interna y externa para Patch-Clamp.

Las soluciones Ringer utilizadas para Patch-Clamp modalidad de célula íntegra fueron: solución externa para corrientes de calcio en mM: 150.0 de NaCl, 3.0 de CsCl, 2.5 de CaCl_2 , 10.0 de glucosa y 5.0 de HEPES. Además 1.0 μM de TTX adicionada a la solución por medio de jeringas. Con una osmolaridad 300 mOsm y un pH de 7.40. Esta solución se burbujeo constantemente con una mezcla de O_2 al 95% y CO_2 al 5%. y se mantuvo la temperatura a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por medio un sistema de recirculación que se describirá posteriormente.

La solución interna para la pipeta de Patch-Clamp, tenía la siguiente composición en mM: 130 de gluconato de Cs, 10.0 de NaCl, 10.0 de EGTA, 5.0 de HEPES, 4.5 de ATP_{Mg} y 0.1 de GTP. De esta solución se preparaban 100 ml, de los cuales se tomaban 10.0 ml en un jeringa para usarse durante el registro. La osmolaridad y el pH se median el día del experimento y debían tener valores de 300 mOsm y un pH de 7.40.

3.2. Cámara de registro.

Se utilizó una cámara de registro para rebanadas de cerebro de rata, fabricada en el laboratorio. Esta consta de una base de acrílico (10.0 X 7.0 cm), en cuya parte central se encuentra la cámara del baño de registro en

la cual se coloca la rebanada (3.5 cm de diámetro y 1.0 cm de altura). Esta cámara posee un sistema de entrada y salida de solución, el cual suministra la solución de LCRA burbujeada con una mezcla de O₂ al 95% y CO₂ al 5% y posee una capacidad de 6 ml. La cámara del baño se encuentra unida por medio de un canal capilar (0.3 mm) a un pozo el cual tiene la función de sostener al tubo de succión y al tubo de oxigenación cuando se realizan las aplicaciones de los fármacos y con esto eliminar las vibraciones originadas por estas acciones. La cámara de registro se encuentra fija sobre la platina de un microscopio biológico (figura 3A).

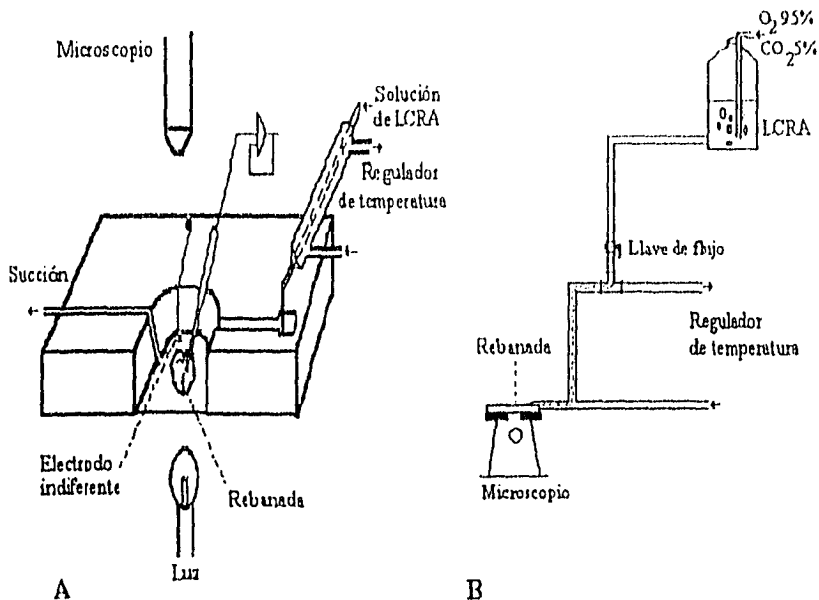


Figura No. 3. Representación esquemática que muestra la disposición de la cámara de registro para los experimentos realizados en el presente trabajo. A muestra la cámara de registro donde se colocaban las rebanadas. B esquematiza al sistema completo de circulación de la solución de LCRA y la cámara de registro.

La solución de LCRA llega a la cámara de registro por gravedad, a una temperatura de 35 ± 0.5 °C gracias a un sistema de contracorriente. Este sistema, emplea una bomba que hace circular agua caliente (48.5 ± 0.5 °C)

por un tubo de mayor calibre (2.40 X 3.8 mm; diámetros interno y externo, respectivamente), mientras que la solución de LCRA circula, gracias a la acción de la gravedad, por un tubo de menor calibre (1.19 X 1.70 mm; diámetros interno y externo, respectivamente), localizado dentro del primero. Tal arreglo permite una transferencia de calor desde el agua caliente hacia la solución de tal manera que cuando la solución de LCRA alcanza la cámara de baño donde se encuentra la rebanada de cerebro, su temperatura es de 35 ± 0.5 °C. La velocidad de flujo de la solución de LCRA en el sistema de baño; fue de 1.5 a 2.0 ml/min, velocidad óptima para registros extracelulares y de patch-clamp (figura 3II) (55,34).

Esta misma cámara de registro fue utilizada para realizar los registros de Patch-Clamp. Con la diferencia de que la cámara fue colocada y fijada sobre un microscopio invertido (Olympus CK2), para poder visualizar la célula que se registraría y el acercamiento de las pipetas.

3.3. Rebanadas de cerebro.

Se utilizaron ratas Wistar de 180-200 g de peso; obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina, mantenidas en las condiciones del laboratorio por una semana antes de realizar los experimentos y con acceso libre al alimento y agua.

El día de registro, se sacrificaba a los animales de experimentación por tracción para distocar los huesos de la nuca; previa sedación con éter. Inmediatamente se cortaba con un bisturí el cuello para abrir la vena yugular e inducir un desangramiento del animal. La piel se abría a lo largo de la línea media del cráneo y era disecada lateralmente hacia abajo. La médula espinal se cortaba a nivel del obex; insertando las tijeras de disección por debajo del hueso en este punto. Posteriormente se realizaba una incisión en el cráneo a lo largo de la línea media. Con el uso de unas pinzas "rongeur" se rompió el hueso del cráneo, eliminando también la duramadre. Después se colocó rápidamente una espátula de vidrio pequeña detrás del cerebelo y debajo del cerebro, para quitarlo cuidadosamente de la caja craneal. Por último los nervios craneales eran cortados con las tijeras de disección.

Una vez extraído el cerebro, éste se colocó dentro de una caja petri

sobre una gasa húmeda con una solución de LCRA oxigenada y con una temperatura de 4.0 ± 0.5 °C. Dentro de este baño se realizó la disección del HL. El cerebro se colocó con la parte ventral hacia arriba para eliminar un bloque de tejido que comprende la parte anterior del cerebro a partir del quiasma óptico o de los cuerpos mamilares, este bloque fue removido del cerebro por medio de un corte coronal. Posteriormente la corteza, el cerebelo y el tálamo fueron removidos con un bisturí de la preparación resultante, dejando al hipotálamo completo.

El hipotálamo fue colocado en una cámara de un Vibrotomo (Campden Instruments LTD); la cual contenía solución de LCRA a 4.0 ± 0.5 °C. Las rebanadas se obtuvieron por cortes coronales de secciones frontales del hipotálamo, la dirección de los cortes tuvo un sentido rostro-caudal. Las dos primeras rebanadas obtenidas del hipotálamo eran desechadas. El área del HL usualmente se encontraba en la tercera rebanada coronal obtenida. Esta estructura se localiza sagitalmente a lo largo del tercer ventrículo, por lo que podían obtenerse 5 rebanadas de un cerebro que contenían esta zona. El grosor de las rebanadas de HL fue de 300 μm , el proceso se realizó bajo visualización estereoscópica. La duración desde que se sacrificó al animal hasta la obtención de las rebanadas de cerebro se realizó máximo en 4 min.

Para el caso del registro de Patch-Calmp, las rebanadas de HL fueron obtenidas de la misma forma que para el caso de los registros extracelulares. La diferencia principal entre ambos procedimientos, consistió en el grosor de las rebanadas obtenidas, que en este tipo de registros fueron de 100 μm (34).

Una vez obtenida las rebanadas de HL, éstas se colocaban dentro de una cámara de registro, con ayuda de dos mallas de nylon (1.0 cm de diámetro) las cuales fijaban y mantenían al tejido en la superficie de la solución LCRA. Posteriormente, se localizaba el HL con ayuda de un microscopio biológico (Carl Zeiss, 40X) y de un atlas estereotáxico de cerebro de rata (57). La solución de LCRA circulante fue mantenida a una temperatura de 20.0 ± 0.5 °C y después se accionaba el sistema de recirculación y calentamiento, para que la temperatura de esta solución en la cámara de registro alcanzara los 35 ± 0.5 °C. La rebanada permanecía en esta situación durante al menos 60 min, antes de iniciar cualquier

maniobra experimental, con la finalidad de lograr un equilibrio de la rebanada con la solución y su temperatura.

3.3.1. Preparación de las células para el registro de Patch-Clamp.

Para obtener un registro de Patch-Clamp de buena calidad, es necesario tener acceso a una membrana celular limpia. En estos experimentos se logró con la ayuda de una pipeta de vidrio pulida con un diámetro aproximado de 5 μm , llena con solución Ringer externa para Patch-Clamp y colocada en un micromanipulador mecánico. Por visualización directa, empleando un microscopio invertido (Olympus CK2), la pipeta se acercó lo más posible a la célula seleccionada en la parte más superficial al borde de la rebanada dentro del HL, posteriormente se aplicaron presiones positivas de 5 a 10 psi. De esta forma el tejido que cubre a la célula se rompe y puede ser removido por succiones leves a través de la misma pipeta. Este proceso de limpieza se realizaba en aproximadamente 10 min (34). Una vez limpia la célula; se procedía a realizar el sello de alta resistencia ($G\Omega$).

3.4. Sistemas de registro.

3.4.1. Registros extracelulares en rebanas del HL.

El registro extracelular unitario se realizó empleando un amplificador (Grass RPS 107), conectado a un preamplificador (Grass P5 AC) y a un osciloscopio (Tektronix 2225); al que se conectó un audiomonitor (Grass AM8). Del preamplificador se conectó una sonda de alta impedancia (Grass) y de ésta se conectaron los electrodos de registro de la rebanada, y los de tierra hacia el baño y a la mesa de registro. El microelectrodo de registro poseía una punta de 0.5 a 1.0 μm y una resistencia ohmica de 18-23 $M\Omega$ medida *in situ*. Estos se obtenían de capilares de borosilicato sódico (1.8 mm de diámetro externo) estiradas en un estirador de pipetas vertical (Vertical Puller, M-700C), posteriormente eran llenados con una solución de NaCl 4 M teñida con verde rápido. Los microelectrodos fueron colocados dentro de la cámara de registro y manipulados cerca de la rebanada de cerebro mediante un micromanipulador (Newport MX300R), con la ayuda de un microscopio biológico (Carl Zeiss).

Las señales registradas eran procesadas primero por el preamplificador. Siendo filtradas con filtros de baja frecuencia (300 Hz) y de alta frecuencia (1 KHz), usando siempre una amplificación de 50 X 100 y el filtro de 60 Hz. En el osciloscopio la señal amplificada era capturada y mediante el uso de un discriminador de ventana sólo se registraban aquellas espigas que se mantenían constantes por un tiempo de 60 min. La amplitud de la ventana la cual se podía definir fijando un valor de voltaje mínimo y máximo, era determinada automáticamente por el programa de captura en base al nivel de la señal registrada. Estas señales fueron enviadas a una computadora PC (Relisys), a la cual se le instaló previamente una tarjeta convertidora analógica-digital, para la captura y análisis de datos (Computerscope, R.C. Electronics). Así, las gráficas del análisis de la frecuencia de eventos contra tiempo fueron muestreadas cada 4 seg durante periodos de 15 min, grabadas y almacenadas en discos flexibles de 3.5" (2HD Verbatim), para su posterior interpretación.

3.4.2. Registros de Patch-Clamp en rebanadas de HL.

Dentro de una caja de Faraday se encontraba una mesa neumática (Newport) que aísla al sistema de registro de las vibraciones mecánicas externas. Sobre ésta, se localizaba la cámara de registro y el micromanipulador mecánico (Newport, MX-300R) que sostenía la sonda de registro y permitía realizar los movimientos necesarios de las pipetas de patch, en aproximaciones de hasta 0.1 μm , para acercarlas a las células y efectuar el sello. De lado opuesto un micromanipulador hidráulico (Narishige, WR-30) se utilizó para deslizar la pipeta de limpiado, la cual estaba conectada a una picobomba neumática (World Precision Instruments, USA), que suministraba presiones positivas de 5 a 10 psi para limpiar la membrana de las células del HL.

Los movimientos de ambas pipetas hacia las células en la rebanada de cerebro fueron visualizados en un microscopio invertido (Olympus CK2) usando siempre el objetivo de 40X. Sobre el primer micromanipulador se colocó la sonda de registro (CV4-Headstage, Axon-instruments, USA) la cual se conectaba al amplificador para Patch-Clamp (Axopatch-1D, Axon-instruments, USA). La señal de salida de éste alimentaba una interfase convertidora analógica-digital (Digidata 1200; Axon-instruments, USA) insertada en una computadora PC (Digital, Venturis) donde se encontraba

instalado el programa pCLAMP6.0 (Axon-instruments,USA). Este sistema de registro, captura, almacén y análisis de datos permitió obtener las corrientes iónica presentes en las células del HL. La salida del preamplificador también se conectó a un osciloscopio (Tektronix) y a un audiomonitor (Grass instrument) los cuales permitieron seguir el proceso de sellado y de registro de corriente a través de la membrana de la célula.

Las pipetas usadas; tanto la de limpiado como la de patch clamp, fueron hechas a partir de capilares de vidrio (diámetro externo 1.5 a 2.0 mm y diámetro interno 1.5 a 1.2 mm), estiradas en dos etapas, usando un estirador de pipetas vertical (Narishige,PP-83). Ambas pipetas fueron pulidas con una microforja (Narishige,MF-83). El diámetro de la punta de la pipeta de limpiado fue de 5 μm y el de la pipeta de patch clamp de aproximadamente 3.0 μm . La pipeta de limpiado se llenó con solución Ringer externa para Patch-Clamp, mientras que la de registro fue llenada con solución interna.

3.4.3. Configuración de Patch-Clamp: célula íntegra.

La técnica de Patch-Clamp nos permite registrar in_situ canales individuales presentes en la membrana celular. Las configuraciones que se pueden realizar con esta técnica son varias y cada una de ellas proporciona información diferente. Esta información puede ser complementaria para resolver las características de dependencia de voltaje, segundos mensajeros, etc. involucradas en los procesos de apertura de los diferentes canales iónicos. En nuestro caso particular, se seleccionó la configuración de célula íntegra por que ésta nos permitió evaluar el efecto del IFN- α sobre la corriente total de Ca^{2+} , como parámetro directo de los efectos que presenta esta citokina sobre la excitabilidad neuronal (Fig 4).

Para realizar el sello entre la pipeta de registro y la célula, se aplicó un pulso de voltaje de -0.5 mV y al mismo tiempo se monitoreó la resistencia de la pipeta. Una vez que la pipeta toca a la célula, la resistencia se incrementa, por lo que el pulso tiende a disminuir en amplitud. Se aplica entonces, una succión leve al interior de la pipeta hasta que una porción de la membrana celular entra a la punta de la pipeta de Patch-Clamp, lo que provoca una completa desaparición del pulso (4B). Después de la formación del sello, se rompe deliberadamente la porción de

membrana celular atrapada dentro de la pipeta por medio de la aplicación de una ligera succión, acompañada de una pequeña vibración mecánica provocada por el amplificador, una vez rota la membrana se logra la configuración de célula íntegra. Este fenómeno se puede visualizar por medio de un repentino aumento en la corriente capacitiva en respuesta a los potenciales de prueba.

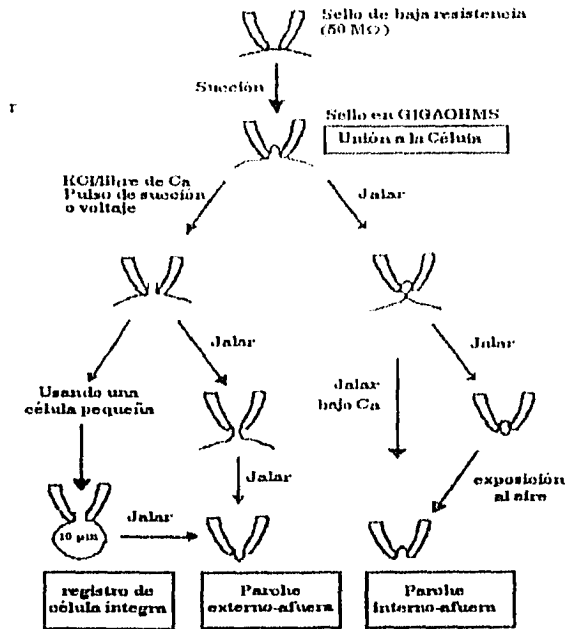


Figura No. 4. Diferentes configuraciones para el registro de Patch-Clamp.

Una vez formado el sello de alta resistencia, se realizaron los registros de las corrientes iónicas. Inicialmente se fijó el potencial de membrana en -80 mV y se aplicaron pulsos de varias intensidades, con una duración de 300 msec para activar y caracterizar las diferentes corrientes de los iones que este tipo de células hipotámicas poseen.

Una vez registradas las corrientes totales de la célula, mediante la

aplicación de soluciones con diferentes composiciones iónicas, fue posible disociar a las corrientes, eliminándose aquellas que no mostraron sensibilidad significativa a los efectos del IFN- α . Por ejemplo; con el empleo de Tetrodotoxina (TTX), se bloquearon las corrientes de sodio, ya que este fármaco es un agente bloqueador específico de canales de sodio dependientes de voltaje. De la misma forma, se utilizó CsCl para bloquear las corrientes determinadas por el ión potasio.

En el caso del registro de las corrientes de calcio, inicialmente éstas se determinaron por medio de la aplicación de pulsos de intensidad creciente (intervalos de 10 mV), con duración de 300 msec, y una frecuencia de 0.5 Hz. Estos pulsos fueron desde los -90 hasta los +60 mV. En tales experimentos se utilizó TTX y CsCl en el mismo baño de registro. Posteriormente, esta estimulación se repitió, tanto en presencia de diferentes concentraciones de IFN- α , como después de eliminar esta citokina de la solución de registro, mediante el lavado de la rebanada. La aplicación de los pulsos de intensidad creciente se realizaron con el propósito de determinar el valor del voltaje en el cual el IFN- α ejerce el efecto máximo, para después, probar con este valor de voltaje, las diferentes concentraciones de IFN- α .

Todas las corrientes registradas fueron filtradas electrónicamente a 1 KHz y digitalmente muestreadas cada 1.5 msec. Sólo en el caso del análisis de las corrientes de cola, las señales fueron filtradas a 10 KHz y muestreadas cada 0.1 msec. Posteriormente, se determinaban las corrientes control, las cuales se registraron en respuesta a la aplicación de un pulso hiperpolarizante de 20 mV a partir del potencial de mantenimiento. Estas corrientes controles fueron usadas para calcular la resistencia de la pipeta y la capacitancia lineal de la membrana celular, así como para la sustracción digital de los componentes lineales de las corrientes de fuga y capacitivas. La densidad de la corriente fue calculada al dividir la corriente registrada entre la capacitancia lineal de la célula. Para posteriormente realizar las curvas de corriente contra voltaje.

3.5. Protocolos de aplicación de fármacos.

Para el caso de los registros extracelulares se realizó la aplicación

de IFN- α , GLUT y GABA. Estos fármacos se aplicaron directamente a la zona del HL por medio de una microjeringa (Hamilton). Para la aplicación del IFN- α y para la de GLUT y GABA se emplearon micropipetas (Oxford, Bechmate). El protocolo de aplicación de los fármacos fue el siguiente: inmediatamente antes de aplicar el fármaco el flujo de la solución de LCRA se detenía; iniciándose, la areación de la cámara de registro directamente con un mezcla de O₂ al 95% y CO₂ al 5% por medio del pozo de succión, con la finalidad de eliminar los movimientos bruscos en la preparación durante el registro. Entonces se realizaba la aplicación del fármaco y se registraba el efecto sobre la actividad eléctrica de las neuronas del HL durante 5 min. Al final de este tiempo el flujo de la solución de LCRA se continuaba y la oxigenación del tejido se realizaba nuevamente a través de la solución.

Gracias al lavado, el fármaco era eliminado de la cámara de registro y entonces se reiniciaba la captura de actividad eléctrica post-aplicación del fármaco. Cabe señalar que se realizaron registros control de la actividad eléctrica espontánea basal de estas neuronas. En estas condiciones se cerraba el flujo de la solución de LCRA sin que se aplicara fármaco alguno, o bien con sólo la aplicación de solución vehículo (albúmina al 2%, en el caso del IFN- α o solución de LCRA en el caso del GABA y GLUT). Los registros se continuaron hasta una hora después de la aplicación de cualquier fármaco, en 4 intervalos de 15 min.

Para el estudio de las modificaciones del IFN- α sobre la respuesta de las neuronas del HL a GLUT y GABA, las maniobras experimentales consistieron en: 1o. aplicar el fármaco (GLUT o GABA) en el HL y registrar el efecto sobre la frecuencia de descarga durante 5 min en los que el fármaco tiene interacción con la zona de registro. Al final de éstos, se procedía a la reapertura del flujo, lo que provocaba el lavado de la sustancia. Después de un período de 10 min se realizaba la administración del IFN- α en las mismas condiciones antes descritas. Una nueva aplicación de GABA o GLUT ocurría después de un tiempo que osciló entre 5 y 35 minutos después de aplicada la citokina. Esta segunda aplicación se realizaba siguiendo exactamente el mismo protocolo que la primera.

Las concentraciones utilizadas de IFN- α para los registros

extracelulares fueron: 750, 1500, 2250 y 3000 UI/ml. Para los neurotransmisores empleados (GLUT y GABA) las concentraciones finales en la cámara de registro fueron: 0.1, 1.0, 10.0, 20.0 y 30 μ M.

Se tuvieron los siguientes grupos controles: a) controles de tiempo contra interrupción de flujo de solución de LCRA con tiempos de 1,3,5,7,10,13,15,17 y 20 min (n=10). b) aplicación de LCRA a la zona de registro (n=8). c) aplicación de solución de albúmina al 2% (n=8). d) aplicación de GLUT o GABA después de una administración previa de GLUT o GABA para analizar la posible sensibilización de las neuronas por aplicaciones consecutivas del fármaco (n=10).

En los registros de Patch-Clamp, el único fármaco analizado fue el IFN- α , el cual se aplicó al baño de registro por medio de un sistema de fast-flow, sin interrumpir el flujo de la solución Ringer extrema para Patch-Clamp. Este sistema de flujo consta de seis tubos individuales (200 μ m de diámetro interno), en los cuales la aplicación del IFN- α se lleva a cabo por gravedad, el flujo era controlado por llaves de paso. Para estos registros las concentraciones de la citokina fueron de 375, 750, 1000, 1500 y 300 UI/ml.

3.6. Análisis estadístico.

3.6.1. Registros extracelulares.

Inicialmente se determinó la frecuencia de descarga por min, de cada una de las neuronas registradas, tanto en condiciones controles como durante y después de la aplicación de cada uno de los fármacos (IFN- α , GABA y GLUT). Con estos datos se determinó el valor promedio, la desviación estándar y el error estándar para cada uno de los registros realizados. Tales valores provenientes de las diferentes aplicaciones de los neurotransmisores se utilizaron para realizar las curvas de porcentaje de respuesta-concentración, comparativas entre los diferentes fármacos, antes y después de haber aplicado la concentración de IFN- α . Con estos datos se realizaron gráficas que relacionan la frecuencia de descarga con el tiempo para determinar el efecto de los fármacos con respecto a la actividad basal.

Para considerar como significativo un cambio en la frecuencia de descarga provocada por algún fármaco se utilizó la prueba de McNemar. Esta prueba calcula el valor crítico de la diferencia encontrada entre dos eventos dependientes; como lo son: la actividad espontánea y la actividad provocada por la aplicación del fármaco. Este valor se conoce como proporción crítica (critical ratio) y cuando es mayor a 1.96, o menor a -1.96, esto respresenta una diferencia estadística de $p < 0.05$ según la distribución normal Z.

3.6.2. Registros de Patch-Clamp.

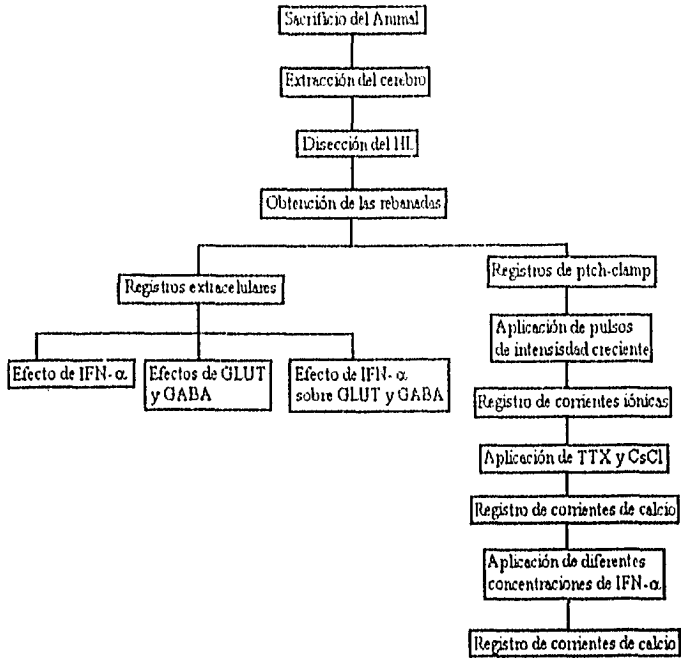
Curvas de corriente contra voltaje (I-V). Las relaciones de corriente contra voltaje se realizaron en condiciones control, durante la aplicación del IFN- α y después de eliminar el fármaco por lavado de la preparación. Para ello se consideró la corriente transitoria con relación al voltaje del pulso de prueba utilizado.

El porcentaje de corriente bloqueada fue determinada en función de la formula $100 \times (1 - I_{\text{fármaco}}/I_{\text{control}})$ donde la I_{control} es la amplitud de la corriente menos la corriente de fuga registrada antes de la aplicación del fármaco y la $I_{\text{fármaco}}$ es la amplitud de la corriente menos la corriente de fuga en presencia del IFN- α . Los resultados siempre se expresaron como el promedio y error estándar del valor medio. El análisis estadístico aplicado a los resultados fue la prueba de Wilcoxon para muestras dependientes, las diferencias entre los registros control y los registros con la aplicación de IFN- α fueron consideradas significativas sólo para una $p < 0.05$.

3.7. Fármacos empleados.

- IFN- α recombinante humano liofilizado, 10^5 Uf/ml reconstituido con una solución de albúmina al 2%. (Immuno Laboratories, INC) Stanlford, TX 77477.
- Acido L-glutámico. 99-100% (SIGMA) St. Louis MO. USA.
- Acido gama-aminobutírico. 100% (SIGMA) St. Louis MO. USA.

3.8. Diagrama de flujo que describe la metodología empleada en el presente trabajo



CAPITULO 4. RESULTADOS.

4.1. Resultados obtenidos de los registros extracelulares.

4.1.1. Caracterización del efecto del IFN- α sobre la respuesta eléctrica del HL y curva de porcentaje de respuesta-concentración.

El efecto de esta citokina se analizó en 54 neuronas del HL registradas extracelularmente. Este conjunto de células mostró una actividad eléctrica promedio de 16.20 ± 1.67 espigas por min (n=54). Del total de neuronas el 87.04% (47) respondieron a la aplicación única de IFN- α , mientras que el 12.96% (7) no mostraron alguna respuesta después de la aplicación de esta citokina. El efecto característico observado en las neuronas que respondieron al IFN- α , fue una inhibición en la frecuencia de descarga la cual se encontró en 35 de estas neuronas hipotalámicas. Este efecto se presentó inmediatamente después de la aplicación del IFN- α , con una duración de 6.52 ± 0.32 min (n=35) y desapareció después de que el IFN- α fué eliminado del baño por lavado de la rebanada. Posteriormente la actividad eléctrica de las neuronas regresó a su nivel basal (Figura 5).

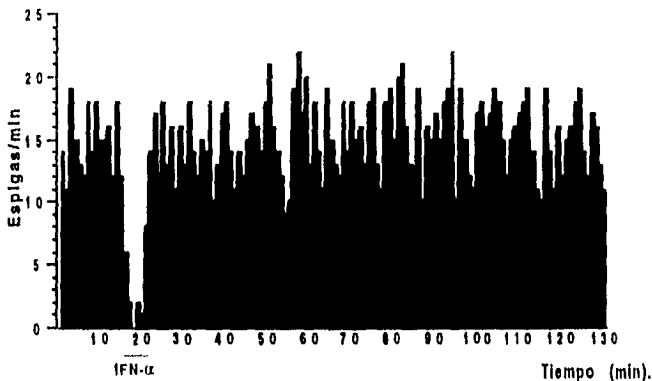


Figura No. 5. Gráfica que relaciona la frecuencia de descarga con la duración del registro. En la que se se observa el efecto de una concentración de 1500 UI sobre la actividad eléctrica de las neuronas del HL. Este efecto de inhibición fue el efecto predominantemente observado (64.8%) después de la aplicación de la citokina.

El otro efecto observado con la aplicación del IFN- α fue un incremento en la frecuencia de descarga la cual se observó en 12 de las neuronas hipotalámicas registradas (cuadro 5).

Cuadro No. 5. Efecto característico del IFN- α sobre células hipotalámicas.

Efectos observados con la aplicación de IFN- α .	↓	↑	↔
% de unidades hipotalámicas.	64.81	22.23	12.96

↓ = Disminución, ↑ = Incremento y ↔ = Sin efecto.

Este efecto se presentó inmediatamente después de realizada la aplicación de la citokina y mostró una duración similar a la observada en las neuronas que responden con un efecto de depresión (6.32 ± 0.29 min, n=12). Una vez que la rebanada es lavada, este efecto tiende a desaparecer y los valores de frecuencia de descarga basal regresan a su estado control (Figura 6).

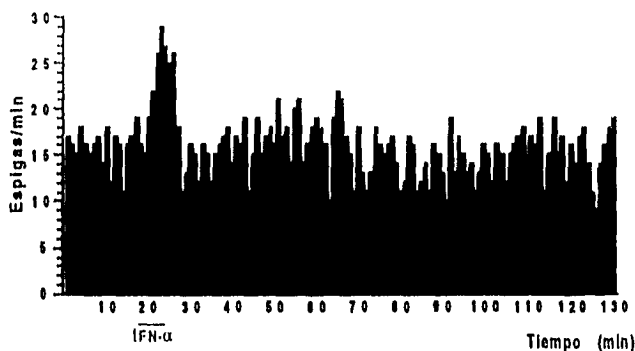


Figura No. 6. En un porcentaje menor (22.23%) de neuronas registradas, el IFN- α provocó incrementos significativos en la frecuencia de descarga de las neuronas hipotalámicas.

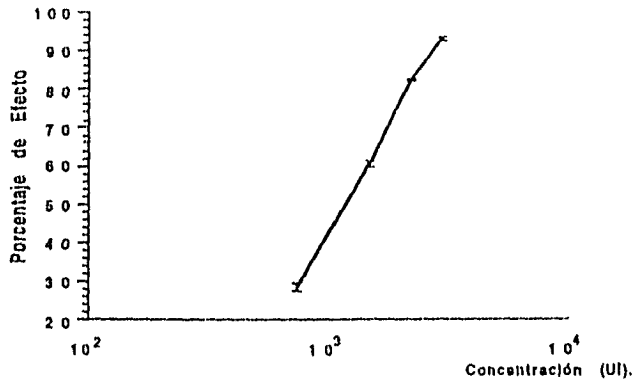
Este efecto de excitación, se presentó a las mismas concentraciones en las que se observaron los efectos de inhibición. Sin embargo, la

excitación fue menos constante a una misma concentración probada; por ejemplo, la aplicación de una concentración de 1500 UI de IFN- α 11 células respondieron con una inhibición mientras que sólo 3 respondieron con un incremento en la frecuencia de descarga.

Se realizó la curva de porcentaje de respuesta concentración, para analizar el efecto característico (inhibición) del IFN- α sobre la actividad eléctrica de estas neuronas (Cuadro 6) (Gráfica 1).

Cuadro No. 6. Efecto del IFN- α sobre la actividad eléctrica de las neuronas del HI. El número entre los paréntesis representa la cantidad de células registradas. Los asteriscos indican las diferencias significativas.

Concentración de IFN- α (UI/ml).	Promedio de frecuencia de descarga/min. (Control)	Promedio de frecuencia de descarga/min. (IFN- α)	% de inhibición
750	16.20 \pm 0.08 (8)	11.6 \pm 0.89 (8)*	28.4
1500	16.18 \pm 0.17 (11)	6.39 \pm 0.36 (11)**	60.5
2250	16.14 \pm 0.45 (8)	2.81 \pm 0.76 (8)**	82.6
3000	16.11 \pm 0.27 (8)	1.08 \pm 0.54 (8)**	93.3



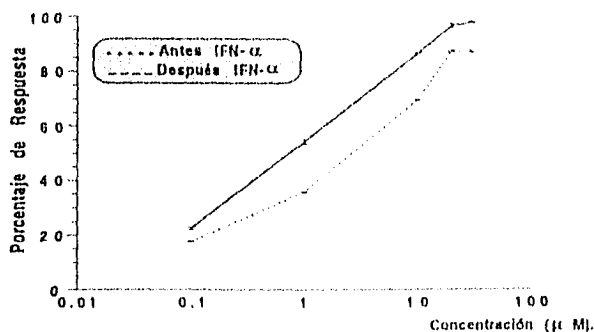
Gráfica No. 1. Curva de porcentaje de respuesta concentración en la que se muestra la dependencia de los efectos inducidos por el IFN- α con la concentración utilizada. El análisis de esta curva mostró que la concentración inhibidora 50% (CI₅₀) de esta citokina es de 1468.130 \pm 0.026 UI (n=35).

4.1.2. Caracterización de la respuesta a GLUT.

Un total de 57 neuronas del HL, fueron registradas extracelularmente y sometidas a la aplicación local, de GLUT. Su promedio de descarga en condiciones basales fue de 17.0 ± 1.55 espigas por min ($n=57$). El 88% (50) de estas células respondieron a las diferentes dosis de GLUT, con un aumento en la frecuencia de descarga; mientras que el 12% (7) restante no respondió a la aplicación de este fármaco (Cuadro 7).

Cuadro No. 7. Efectos provocados por el GLUT sobre la actividad eléctrica de las neuronas del HL. El número entre paréntesis representa la cantidad de células registradas. Los asteriscos indican las diferencias significativas (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Concentración de GLUT (μM)	Promedio de frecuencia de descarga/min. (Control)	Promedio de frecuencia de descarga/min. (GLUT)	% de excitación
0.1	$17.56 \pm 0.65(10)$	$19.29 \pm 0.63(10)^*$	9.87
1.0	$16.62 \pm 0.34(10)$	$22.74 \pm 0.40(10)^*$	36.85
10.0	$17.27 \pm 0.05(10)$	$28.21 \pm 0.19(10)^{**}$	63.37
20.0	$18.05 \pm 0.16(10)$	$34.05 \pm 0.20(10)^{**}$	88.60
30.0	$17.13 \pm 0.23(10)$	$32.20 \pm 0.15(10)^{**}$	87.91



Gráfica No. 2. Curvas de porcentaje de respuesta-concentración elaboradas con los resultados obtenidos después de administrar varias dosis de GLUT en rebanadas de HL. El análisis de ambas curvas mostró el valor de las CE_{50} para GLUT y para IFN- α y GLUT, siendo estas de 7.1087 ± 12.462 ($n=50$) μM y 1.1955 ± 0.514 μM ($n=35$) respectivamente.

Con estos datos, se construyó la curva que relaciona el porcentaje de efecto con la concentración y se determinó la Concentración Excitadora 50 para GLUT (CE₅₀) (Gráfica 2).

El efecto provocado por el GLUT sobre la excitabilidad de las neuronas del HL fue dependiente de su concentración, y se observó inmediatamente después de su aplicación. Este efecto mostró una duración de 5.02 ± 0.36 min ($n=50$); posteriormente, la frecuencia de descarga disminuyó hasta retornar a su estado basal una vez que el fármaco fue eliminado por lavado de la preparación (Figura 7).

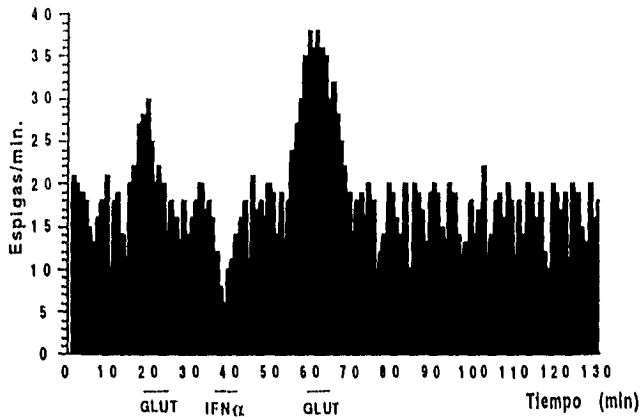


Figura No. 7. Se muestra la frecuencia de descarga en función del tiempo. En primer plano se observa el efecto de la aplicación única de GLUT sobre la actividad eléctrica de neuronas del HL. Se muestra también el efecto de potenciación inducido por el IFN- α sobre las respuestas provocadas por la aplicación de GLUT 10 min después de la adición de la citokina.

4.1.3. Caracterización de la respuesta a GABA

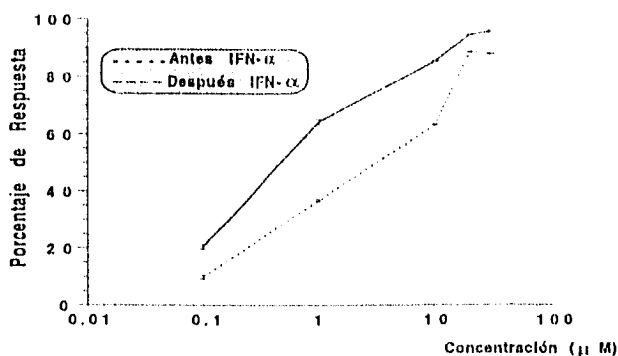
Para analizar la acción de este fármaco, se registraron extracelularmente un total de 55 neuronas del HL. Estas células mostraron un promedio en su frecuencia de descarga basal de 17.6 ± 1.67 espigas por

min (n=55). Del total de células, el 91% (50) mostró una disminución en su frecuencia de descarga, mientras que el 9% (5) restante de las neuronas registradas no respondieron a tal maniobra experimental (cuadro 8).

Cuadro No. 8. Efecto de GABA sobre la actividad eléctrica de las neuronas del HL. El número entre parentesis indica la cantidad de células registradas. Los asteriscos señalan las diferencias significativas (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Concentración de GABA (μM)	Promedio de frecuencia de descarga/min. (Control)	Promedio de frecuencia de descarga/min. (GABA)	% de inhibición
0.1	17.0 \pm 0.12(10)	14.0 \pm 0.10(10)*	17.64
1.0	18.53 \pm 0.34(10)	11.90 \pm 0.02(10)*	35.80
10.0	19.20 \pm 0.13(10)	7.40 \pm 0.31(10)**	61.41
20.0	17.13 \pm 0.64(10)	2.20 \pm 0.40(10)**	87.16
30.0	16.81 \pm 0.92(10)	2.20 \pm 0.32(10)**	86.92

De los datos anteriores se obtuvo la curva de porcentaje de respuesta-concentración para GABA y se determinó la Concentración Inhibidora 50 (CI_{50}) (Gráfica 3).



Gráfica No. 3. Curvas de porcentaje de efecto-concentración que muestra el efecto dependiente de la concentración de GABA y de IFN- α -GABA sobre la frecuencia de descarga en neuronas del HL. De estas curvas se calcularon las CI_{50} : $5.2433 \pm 18.590 \mu\text{M}$ (n=50) y $0.4773 \pm 1.356 \mu\text{M}$ (n=40) respectivamente. Se observa como la adición previa de IFN- α desplaza la curva hacia la izquierda y hacia arriba, lo que farmacológicamente se interpreta como un efecto potenciador.

También el efecto del GABA sobre la excitabilidad celular de estas neuronas, fue dependiente de la dosis y se presentó inmediatamente después de su aplicación. La duración del efecto fue de $5.30 \pm 0.46'$ min ($n=50$), posterior a este tiempo, la actividad eléctrica de las neuronas regresó a su actividad control basal (Figura 8).

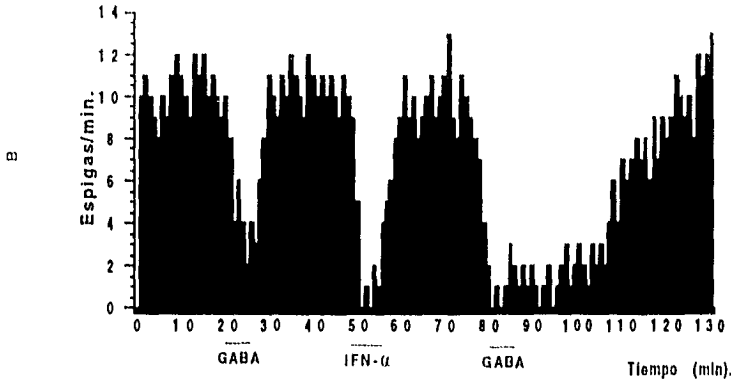


Figura No. 8. La aplicación local de GABA provocó una reducción en la frecuencia de descarga de las neuronas hipotálamicas. Tal decremento fue mucho mayor, con la misma concentración, cuando el GABA se aplica después de la aplicación de 1500 UI de IFN- α .

4.1.4. Efectos del IFN- α sobre la respuesta a GLUT por neuronas del HL

En 35 neuronas del HL, se analizó el efecto del IFN- α y sobre la respuesta de las neuronas hipotálamicas a GLUT. Estas células mostraron una frecuencia de descarga de 13.54 ± 0.92 espigas/min ($n=35$). Inicialmente se caracterizaba el efecto de GLUT al aplicar alguna de las diferentes concentraciones empleadas (0.1, 1.0, 10.0, 20.0 y 30 μ M) y 10 min después se realizaba la administración del IFN- α (1500 UI). Posteriormente se repetía la aplicación de GLUT a la misma concentración previa y se registraba el efecto observado por tales aplicaciones (Cuadro 9).

Cuadro No. 9. Efecto del IFN- α sobre la respuesta de las neuronas del HL a GLUT. El número que se presenta entre paréntesis indica la cantidad de neuronas registradas. Los asteriscos señalan las diferencias significativas (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Concentración de GLUT (μ M)	Promedio de frecuencia de descarga/min. (Control)	Promedio de frecuencia de descarga/min. (GLUT).	% de excitación
0.1	13.53 \pm 0.36(7)	16.57 \pm 0.43(7)*	22.50
1.0	13.45 \pm 0.02(7)	20.74 \pm 0.75(7)**	54.23
10.0	13.49 \pm 0.78(7)	25.19 \pm 0.13(7)**	86.65
20.0	13.55 \pm 0.32(7)	26.61 \pm 0.78(7)**	96.37
30.0	13.60 \pm 0.12(7)	26.87 \pm 0.34 (7)**	97.58

Los resultados obtenidos muestran que la aplicación de IFN- α provoca cambios en la respuesta de estas neuronas al GLUT. Estos cambios, consisten en una potenciación de los efectos del GLUT comparados con la respuesta control; ya que la aplicación de GLUT después de la aplicación de IFN- α , provocó efectos con una duración de 9 ± 0.43 min ($n=35$), en contraste con los 5.42 ± 0.36 min ($n=50$) de duración observados antes de la aplicación de la citokina. En ambos casos la actividad eléctrica regresó a su nivel basal después de realizar el lavado de la rebanada (Figura 7). Cuando el GLUT se administró a intervalos variables después de la aplicación de IFN- α , se encontró que el efecto de potenciación es transitorio; éste se inicia al menos después de 5 minutos de la aplicación de la citokina y persiste hasta los 25 min. La administración de GLUT después de este tiempo, induce un efecto muy similar al que se obtiene por la aplicación de este neurotransmisor antes de la aplicación del IFN- α .

4.1.5 Efectos del IFN- α sobre la respuesta a GABA por neuronas del HL

Para analizar tal efecto, se registró la actividad eléctrica de 40 neuronas, las cuales en promedio presentaron una frecuencia de descarga de 14.30 ± 1.23 espigas/min ($n=40$). En este caso, se realizaron dos aplicaciones de GABA (0.1-30 μ M) una previa y una posterior a la aplicación única de una dosis de 1500 UI de IFN- α , en la zona de registro del HL (Cuadro 10).

Cuadro No. 10. Efecto de potenciación del IFN- α sobre la respuesta a GABA. El número que se muestra entre paréntesis indica el número de neuronas hipotalámicas analizadas. Los asteriscos señalan las diferencias significativas.

Concentración de GABA (μ M)	Promedio de frecuencia de descarga/min. (Control)	Promedio de frecuencia de descarga/min. (GABA)	% de inhibición
0.1	14.36 \pm 0.76(8)	11.41 \pm 0.72(8)*	20.54
1.0	15.24 \pm 0.12(8)	5.43 \pm 0.94(8)**	64.34
10.0	13.45 \pm 0.03(8)	1.96 \pm 0.17(8)**	85.36
20.0	14.67 \pm 0.19(8)	0.80 \pm 0.001(8)**	94.54
30.0	14.46 \pm 0.26(8)	0.62 \pm 0.002(8)**	95.67

En forma similar a lo ocurrido con GLUT, el IFN- α provocó una potenciación de los efectos inducidos por GABA. La duración del efecto del GABA después de la aplicación de IFN- α fue de 45.32 \pm 0.41 min (n=40). Esta potenciación se presentó para todas las aplicaciones de GABA y se iniciaba desde que finalizaba la administración de IFN- α hasta los 25 min posteriores a ésta. De tal manera que el efecto de potenciación no se observó cuando la aplicación de GABA se realiza después de este tiempo (Figura 8).

Para analizar el efecto de potenciación del IFN- α sobre la respuesta de las células del HL a GLUT y GABA se tomaron en cuenta tres parámetros que fueron: la CI_{50} , CE_{50} , el porcentaje de respuesta y la duración del efecto para cada uno de los fármacos (GLUT y GABA) antes y después de la aplicación de IFN- α . Los resultados para las C_{50} indican claramente un efecto de potenciación, que se puede observar en las curvas de porcentaje de respuesta-concentración. En ambos casos se encontró un desplazamiento de la curva hacia la izquierda y arriba. Esto indica que para producir el 50% de efecto ya sea con GLUT o con GABA la concentración necesaria es menor después de la aplicación del IFN- α . Por otra parte el porcentaje de respuesta provocado por GLUT y por GABA después de administrar la citokina fue mayor en comparación con la aplicación de ambos neurotransmisores antes de administrar el IFN- α . Por último, la duración de los efectos también mostró diferencias significativas. Cabe señalar que después de la aplicación del IFN- α la duración del efecto fue mayor, aún después de ser eliminado el GLUT o el

GABA por lavado de la rebanada (sólo permanecían en interacción con el tejido 5 min) (Cuadro 11).

Cuadro No. 11. Comparación entre las CE_{50} , Cl_{50} , porcentaje y duración del efecto provocado por los neurotransmisores utilizados, antes y después de una aplicación de IFN- α . Los números dentro del paréntesis representan la cantidad de neuronas registradas y los asteriscos indican las diferencias significativas comparados con el grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Aplicación de IFN- α	GLUT CE_{50} (μ M)	GABA Cl_{50} (μ M)	% de efecto GLUT (10 μ M)
Antes (Control)	7.1087 \pm 12.462(50)	5.2433 \pm 18.590(50)	61.41 \pm 5.43(10)
Después	1.1955 \pm 0.514(35) * *	0.4773 \pm 1.356(40) * *	85.36 \pm 8.13(7) * *
Aplicación de IFN- α	% de efecto GABA (10 μ M)	Duración de efecto (GLUT)	Duración de efecto (GABA)
Antes (Control)	63.37 \pm 3.82(10)	5.02 \pm 0.30''min(50)	5.30 \pm 0.46''min(50)
Después	86.65 \pm 2.15(8) * *	9.0 \pm 0.43''min(35) * *	45.32 \pm 0.41''min(40) * *

4.2. Resultados obtenidos de los registros de Patch-Clamp.

En total se realizaron 56 registros de Patch-Clamp en 56 neuronas del HL. Doce de ellas fueron utilizadas para registrar las corrientes totales celulares; mientras que en las 44 restantes únicamente las corrientes de calcio fueron registradas. Quince de estas neuronas fueron empleadas para analizar el efecto de diferentes concentraciones de IFN- α sobre las corrientes de calcio inducidas por un pulso depolarizante que llevo el potencial de membrana a 20 mV. Por otro lado, en 29 de estas neuronas se observó el efecto de una concentración de IFN- α (1000 UI), sobre las corrientes de calcio inducidas por pulsos depolarizantes de varias intensidades.

En términos generales, las condiciones del sello fueron excelentes durante los primeros 30 minutos de registro, posteriormente se inició la reducción espontánea de las corrientes ("rundown") la cual nunca fue

mayor al 20% después de una hora de registro. Por esta razón únicamente se registraban las células durante la primer hora de realizado el sello de alta impedancia.

Cuando se aplicaron diferentes pulsos comando en células mantenidas en soluciones que no contenían bloqueadores de canales, se observaron corrientes como las que se muestran en la figura 9. Cuando el valor del potencial de membrana se lleva a -40 mv, se observa una pequeña corriente entrante rápida y otra lenta. Ambas corrientes se incrementan conforme el pulso comando se aumenta, aunque la que muestra mayor crecimiento es la corriente entrante transitoria inicial. Cuando el valor del pulso fue de 60 mV, el cual corresponde a un potencial de membrana de aproximadamente -20 mV, se empieza a observar una corriente saliente positiva, la cual es aún mayor con pulsos comandos de 70 mV. El uso de tetrodotoxina (TTX), reduce considerablemente la corriente pico en estos registros (Figura 10), lo que sugiere que se trata de corrientes de Na^+ sensibles a TTX, mientras que la aplicación de soluciones con cloruro y gluconato de Cs reduce significativamente la corriente saliente positiva, indicando con ello de que el principal componente de esta corriente lo constituye el flujo de iones K^+ .

La aplicación de IFN- α en concentraciones que oscilaron entre 250 y hasta 3000 UI, no modificaron en forma significativa esta corriente entrante como la corriente saliente. Cuando se utilizaron soluciones que contenían ambos tipos de bloqueadores, es decir TTX (1 μM) o cloruro y gluconato de Cs (130 mM), se obtienen registros como el que se muestra en la figura 10 los cuales corresponden básicamente a corrientes de calcio.

En estas condiciones, con valores de potencial de membrana desde -60 mv se detecta una pequeña corriente transitoria, la cual se observa hasta con valores de -10 mV (Figura 10); sin embargo, a partir de los -20 mv, se detecta una corriente transitoria, la cual se incrementa en forma importante desde 0 hasta 50 mV, alcanzando su valor máximo a los 30 mV. Ambos tipos de corrientes se asemejan a las corrientes LVA y HVA de Ca^{2+} , descritas en varios grupos celulares (62).

Cuando estas neuronas fueron perfundidas con una concentración de IFN- α (1000 UI) se observó una reducción significativa de las corrientes registradas con voltajes que van desde -40 hasta 30 mV de los pulsos

comandos como se observa en la figura 11. Esta dosis de IFN- α provocó una reducción de aproximadamente el $42.8 \pm 6.8 \%$ ($n=29$) de la corriente de calcio registrada cuando el potencial de membrana fue llevado a 30 mV. Por otro lado, con la utilización de un pulso comando similar y la aplicación de diferentes concentraciones de IFN- α , se encontró que este efecto es dependiente de la concentración (Figura 12).

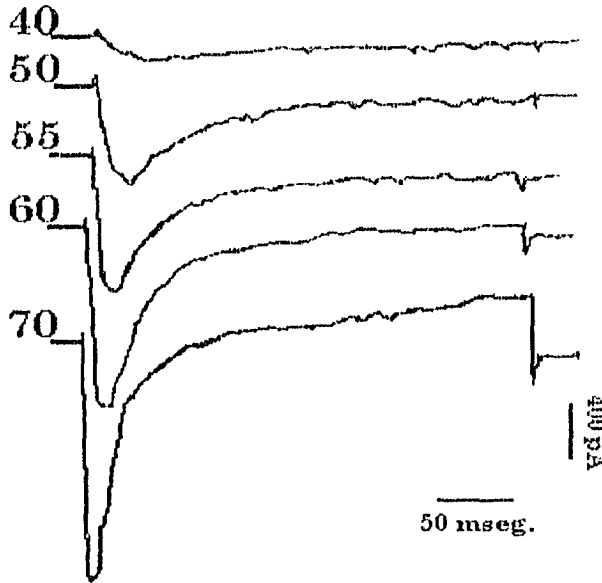


Figura No. 9. Se muestran los registros representativos de corrientes celulares, obtenidas cuando se emplean soluciones que no contienen ningún tipo de bloqueador. En este caso las corrientes que se muestran corresponden a la suma algebraica de las corrientes de sodio, potasio y calcio, fundamentalmente.

La figura 13 muestra la curva de voltaje contra corriente característica de la situación control y del efecto resultante de la aplicación de IFN- α (1000 UI) sobre estas mismas corrientes. Se observa que el efecto de esta citokina se ejerce sobre las corrientes generadas con voltajes elevados, es decir en corrientes de tipo LVA y HVA. En esta

misma figura se aprecia que la eliminación del IFN- α por el lavado del tejido no desaparece del todo los efectos provocados por esta citokina. Aún después de 30 minutos de eliminada la citokina del baño de tejidos, los efectos depresores del IFN- α aún son detectados. Este efecto se muestra con mayor claridad en la figura 14.

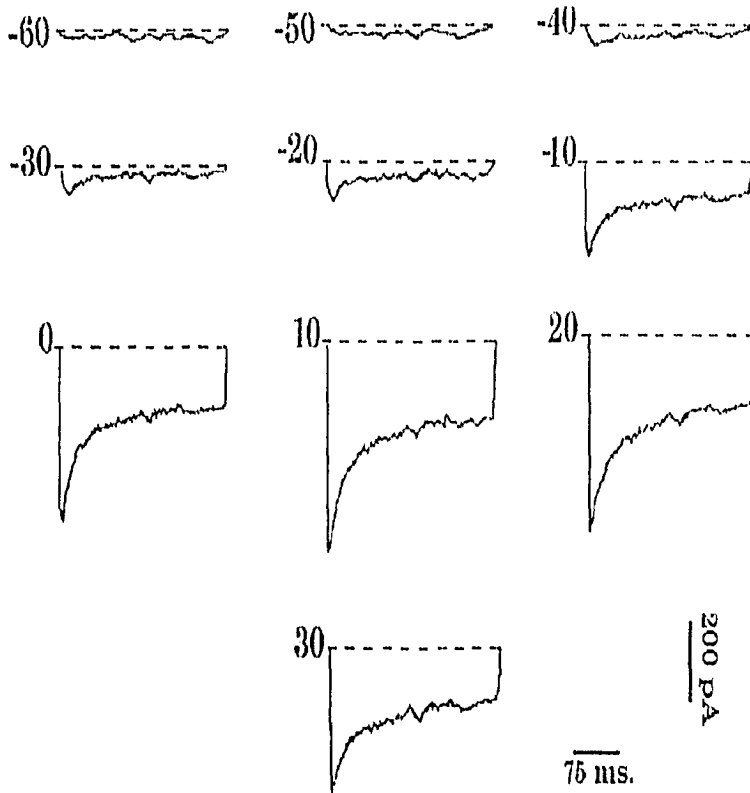


Figura No. 10. Corrientes de calcio. La aplicación de pulsos depolarizantes a neuronas que reciben una perfusión con soluciones intra y extracelulares que contienen TTX, CsCl y gluconato de Cs, induce la aparición de este tipo de corriente. Las corrientes que se observan son fundamentalmente de calcio, y se presentan básicamente en todos los niveles de despolarización aquí mostrados. La máxima corriente registrada se obtuvo con la aplicación de un pulso que depolarizó la membrana celular hasta 10 mV.

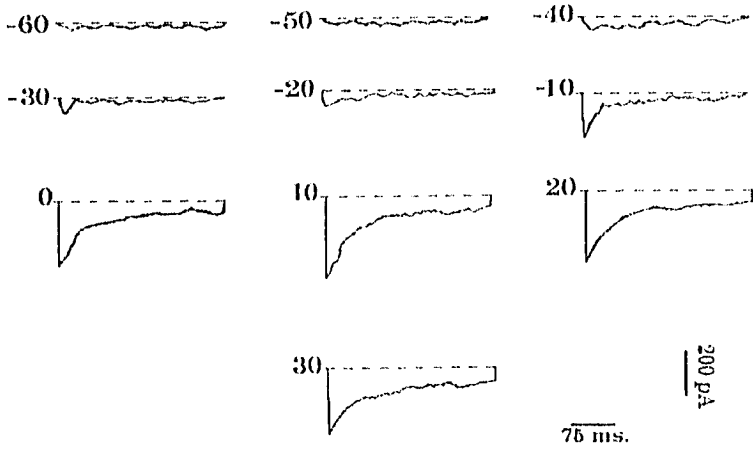


Figura No. 11. Cuando las células fueron perfundidas con 1500 UI de IFN- α , la intensidad de las corrientes se redujeron en forma sensible y significativa. Las corrientes más afectadas fueron las que se obtuvieron por la aplicación de pulsos de alto voltaje, las cuales son caracterizadas como corrientes de calcio de tipo HVA. Sólo se encontraron cambios en la amplitud de la corriente de calcio registrada.

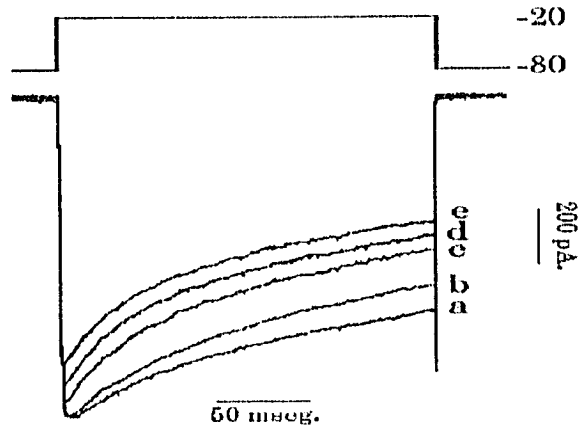


Figura No. 12. Familia de curvas de las corrientes de calcio registradas durante la aplicación de diferentes concentraciones de IFN- α . El pulso depolarizante utilizado llevó el potencial de membrana hasta 20 mV. Las concentraciones de IFN- α empleadas fueron de b) 375 UI/ml, c) 750 UI/ml, d) 1500 UI/ml y e) 3000 UI/ml. En a) se observa la corriente control registrada en ausencia de la citokina.

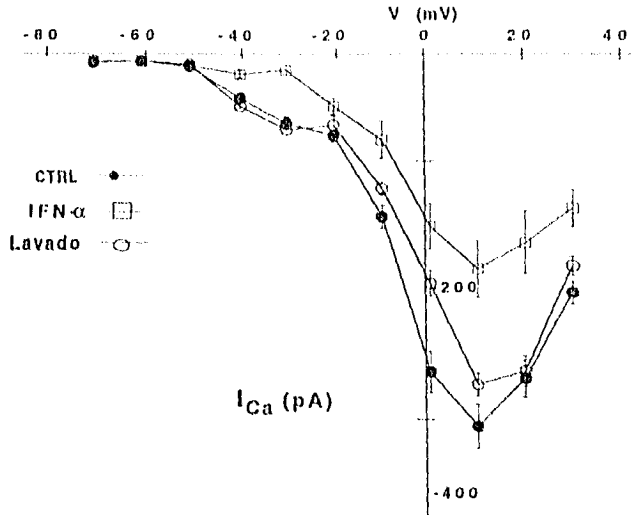


Figura No. 13. Curva voltaje-corriente que muestra los efectos provocados por el IFN- α (1000 UI) sobre las corrientes de calcio en 29 células registradas. Se aprecia un efecto sobre las corrientes LVA y HVA, así como la ausencia de su recuperación después de retirado el IFN- α .

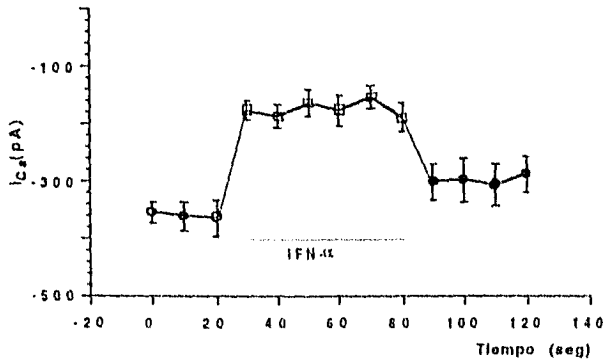


Figura No. 14. Los efectos inducidos por el IFN- α (1000 UI) sobre las corrientes de calcio son de larga duración. Esta gráfica muestra la reducción que persiste en las corrientes de calcio aún después de 30 minutos de retirado el IFN- α del baño.

CAPITULO 5. DISCUSION.

Los resultados del estudio muestran que el IFN- α posee la capacidad de modificar la excitabilidad de las células del LH, ejerciendo su acción sobre algunos de los parámetros involucrados en esta propiedad neuronal, tales como la disminución en la frecuencia de descarga y en la corriente de Ca²⁺ a través de la membrana celular.

La actividad eléctrica de las neuronas del SNC, está determinada por las propiedades que presentan sus membranas celulares como son: la permeabilidad selectiva a cierto tipo de iones (Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Cl⁻, principalmente), la presencia de receptores y canales que modulen la entrada y salida de éstos a través de la membrana celular. De esta forma, cualquier sustancia que modifique estas propiedades influirá directamente sobre la actividad eléctrica celular. Las sustancias que son capaces de modificar las propiedades membranales pueden realizarlo a través de diferentes mecanismos que involucran a algunas de las propiedades fisicoquímicas de la membrana o por su interacción con los receptores o canales presentes en ellas. El resultado subsecuente de esta modificación será un cambio en las propiedades eléctricas de la neurona, que se puede manifestar con un incremento o decremento en la frecuencia de descarga, en la corriente de iones a través de la membrana y en el potencial de acción que las células presenten a diferentes estímulos.

El IFN- α indujo cambios significativos en la frecuencia de descarga neuronal del HL. El efecto característico provocado por esta citokina en el 64.81% del total de neuronas registradas, es una disminución en su frecuencia de descarga. Esta inhibición presentó características específicas y reproducibles en el rango de concentraciones utilizadas (750 a 3000 UI). El inicio del efecto tuvo una latencia de 5.0 ± 3.34 seg (n=32) después de ser aplicada la citokina en la zona de registro. La latencia y la duración del efecto sugieren que el IFN- α regulan algunas propiedades de la membrana que están involucradas con la actividad eléctrica neuronal. Este efecto se presenta cuando la citokina tiene contacto con las células del HL y termina paulatinamente cuando es eliminada del baño de registro por el lavado de la rebanada. El efecto predominante es dependiente de la concentración de IFN- α utilizada.

En base al análisis de la curva de porcentaje de efecto-concentración para el IFN- α , se determinó la CI_{50} que corresponde a 1468.130 ± 0.026 UI (n=35) (Gráfica 1). De esta forma, el hecho de que las neuronas del HL respondan significativamente con un patrón de respuesta característico y específico a las aplicaciones de las concentraciones utilizadas de IFN- α , las cuales son comparables con las concentraciones fisiológicas reportadas (10-5000 UI/ml), sugiere que el HL es un sitio blanco para la acciones neurológicas de esta citokina.

Al analizar la respuesta de las células a dos neurotransmisores cuyos efectos dentro del SNC han sido ampliamente caracterizados y reproducibles en una gran variedad de neuronas. Se encontró que el GLUT y el GABA ejercen sus efectos característicos (excitación e inhibición, respectivamente) en forma dependiente de su concentración y de manera reproducible. Estos efectos aparecen con tiempos de latencia semejantes al mostrado por el IFN- α (4.22 ± 1.56 seg (n=50) y 5.12 ± 0.56 seg, respectivamente). La duración de ambos efectos presentó diferencias significativas con la duración observada para el efecto del IFN- α . Por otro lado, se analizaron los efectos del IFN- α sobre las neuronas que no respondieron a la aplicación tanto de GLUT como a la de GABA, encontrándose que estas células no responden significativamente a la aplicación de la citokina. Este hecho habla de la selectividad de efectos que la citokina tiene sobre las neuronas del HL.

Los efectos provocados por el IFN- α son diferentes a los evocados por neurotransmisores presentes en el HL. Los neurotransmisores ejercen efectos cuya aparición y finalización es inmediata y sólo depende de la presencia del neurotransmisor. Contrariamente, en el caso del IFN- α , el inicio del efecto es mediato y su finalización es paulatina, incluso la duración del efecto excede a la permanencia del IFN- α en el baño de registro ($40.0 \pm 7.34\%$ n=32). Este efecto se puede explicar con base a las características fisicoquímicas del IFN- α ya que se trata de una molécula proteica de alto peso molecular que presenta un coeficiente de bipartición agua/lípido menor a 1 (17a). Esta propiedad podría influir para que el tiempo de permanencia de la citokina en la rebanada sea mayor y por lo tanto el efecto sea más duradero en comparación con el GLUT y el GABA. Estos datos sugieren que la interacción entre el IFN- α y la membrana

celular, es diferente a la que muestran los neurotransmisores examinados en el presente estudio.

Las acciones del IFN- α sobre la actividad eléctrica de las neuronas de rebanadas de HL, son diferentes a las reportadas en animales íntegros registrados en esa misma región. En este experimento, el principal efecto observado fue una disminución en la frecuencia de descarga de las neuronas; mientras que en animales íntegros las respuestas muestran una mayor variabilidad. Probablemente esto se deba al tipo de preparación, ya que en los registros realizados en rebanadas de cerebro, el número de aferencias y eferencias de una neurona se reduce considerablemente. Tal reducción impide la posible influencia de otras estructuras, las cuales son sensibles al IFN- α . Por tal razón, en esta preparación se observa una acción más directa de esta citokina con las neuronas del HL.

Otra de las respuestas inducidas por el IFN- α fue un incremento en la frecuencia de descarga. Tanto la latencia como la duración de este efecto fueron semejantes a las observadas durante los efectos inhibidores provocados por la citokina (4.01 ± 1.43 seg y 6.32 ± 0.29 min; $n=12$, respectivamente). En estas neuronas no se observó el efecto de potenciación sobre la respuesta a GLUT y GABA, ya que este fenómeno sólo se presentó en aquellas células que respondieron a la aplicación de IFN- α con una inhibición en su frecuencia de descarga. Este hecho habla de la especificidad de los efectos que esta citokina tiene sobre las neuronas del HL. Por último las neuronas que no respondieron a la aplicación de esta citokina muestran el efecto característico desencadenado por la aplicación de GLUT o GABA. El tiempo de latencia, la duración y el porcentaje de efecto fueron similares a los observados por las aplicaciones de GLUT y GABA antes de la administración de IFN- α . Por último las neuronas que no respondieron a la aplicación de la citokina tampoco presentaron los efectos de potenciación.

Estos efectos potenciadores del IFN- α sobre la respuesta de las neuronas hipotalámicas a GLUT y GABA se examinaron tomando en cuenta las CE_{50} y CI_{50} para GLUT y GABA, calculadas a partir de las curvas de porcentaje de efecto-concentración. La aplicación previa de IFN- α a la zona de registro, provocó cambios en las concentraciones 50 de ambos

neurotransmisores. Esto indica que la citokina permite alcanzar el mismo efecto a concentraciones seis y once veces menores que las que se utilizan en ausencia de IFN- α para GLUT y GABA, respectivamente. (GLUT: $CE_{50}=7.1087 \pm 12.462 \mu\text{M}$ (n=50) antes; $CE_{50}=1.1955 \pm 0.514 \mu\text{M}$ (n=38), después de IFN- α) (GABA: $CI_{50}= 5.2433 \pm 18.590 \mu\text{M}$ (n=50) antes; $CI_{50}=0.4773 \pm 1.356 \mu\text{M}$ (n=40), después de IFN- α). Este fenómeno de potenciación se observa farmacológicamente en las curvas de porcentaje de respuesta-concentración, como un desplazamiento de las curvas hacia la izquierda y hacia arriba.

Estos efectos sugieren que la interacción del IFN- α con la neurona, ejerce cambios en las propiedades de la membrana celular, de tal forma que modifica la relación entre los neurotransmisores y sus receptores respectivos, ya sea a nivel de la misma membrana celular o en los mecanismos de transducción intracelular que utilizan estas sustancias. Aunque aún desconocemos con exactitud el mecanismo de acción empleado por el IFN- α para modificar la excitabilidad neuronal en las condiciones descritas para la citokina; i.e., con la latencia, duración e intensidad observadas; por los resultados obtenidos de los experimentos de patch-clamp, es posible que estos efectos del IFN- α sean consecuencia de una acción sobre las corrientes transmembranales de Ca^{2+} . Por otro lado, los resultados mostrados en este trabajo indican que el sitio de acción donde se lleva a cabo el efecto de esta citokina es postsináptico, pues modifica la actividad de los neurotransmisores que en condiciones fisiológicas reconocen a sus receptores y actúan a este nivel. Sin embargo, con estos resultados no es posible descartar una interacción del IFN- α a nivel presináptico. Lo que sugiere que es necesario realizar estudios encaminados a determinar la interacción de esta citokina con la sinapsis neuronal del HL. Para ello podrían utilizarse técnicas que permitan descartar el sitio de interacción de esta sustancia, como los registros intracelulares con fijación de voltaje, la administración de fármacos con sitios de acción ya establecidos o el uso de neurotoxinas con efectos selectivos ya sea pre o postsinápticos (24).

Los neurotransmisores elegidos para ser empleados en el presente estudio (GLUT y GABA), se encuentran distribuidos ampliamente en todo el SNC de varios organismos y están implicados en los mecanismos de

regulación de varios sistemas, además de ser fuentes moduladoras hacia otras sustancias que participan en los mismos procesos homeostáticos (11). Desconocemos aún si este efecto de potenciación ejercido por el IFN- α puede extenderse hacia otros neurotransmisores localizados en esta misma estructura.

El GLUT realiza sus efectos a nivel de receptores ionotrópicos descritos como Kainato (KA), Acido propiónico-Alfa-amino-3hidroxi-5metil-4isoxazole (AMPA) y N-metil-d-aspartato (NMDA) y a través de receptores metabotrópicos que regulan la entrada de Ca²⁺ a las neuronas. Este tipo de receptores son extremadamente plásticos, además de ser modulados por sustancias diferentes a GLUT (24). Entonces, resulta atractivo sugerir que esta citokina, mediante la posible interacción con alguno de estos receptores, modifique la respuesta a GLUT; sin embargo, la observación del mismo tipo de efecto sobre la respuesta a GABA, neurotransmisor con un mecanismo de acción completamente diferente al de GLUT (24); sugiere una acción inespecífica sobre la excitabilidad celular, o bien una acción sobre un receptor que reconozca específicamente al IFN- α y que este asociado a varios tipos de receptores. Además, este receptor podría de alguna manera estar acoplado a un canal iónico, quizá a través de un sistema de segundos mensajeros. Para analizar tal posibilidad resulta indispensable determinar el efecto sobre cada uno de estos diferentes receptores a GLUT y GABA, mediante el uso de antagonistas específicos; esta información brindaría daría más información sobre el papel neuromodulador del IFN- α . Esta acción potenciadora del IFN- α sobre el GABA, ya ha sido descrita para otra citokina, la interleucina-1 β en cerebro de ratones y pollos (63a). Para complementar el presente trabajo también es necesario el describir cualquier tipo de participación de segundos mensajeros involucrados en los efectos de esta citokina sobre las neuronas hipotalámicas. Considerando, con base al tiempo en el cual se presenta y a la duración de este efecto, que es muy posible que se trate de acciones independientes de sus efectos mediados a través de la maquinaria genética celular (acción genómica).

La posibilidad de que en estos efectos estén involucrados los receptores típicos descritos para el IFN- α , es muy remota; principalmente

porque a estos receptores, los cuales participan en funciones inmunológicas, son específicos de especie. Mientras que los efectos clínicos, neurológicos y aquellos provocados sobre la actividad eléctrica cerebral pueden ser inducidos por IFN proveniente de otras de especies (78,83). Esto indica que el IFN- α ejerce sus acciones inmunológicas y neurológicas utilizando mecanismos diferentes; quizá por su unión a dos tipos de receptores diferentes. Una posibilidad la constituyen los receptores opioides, ya que la naloxona es capaz de modificar algunos de los efectos neurológicos provocados por el IFN- α (16); además de que esta citokina es capaz de modificar fenómenos opioides típicos como la tolerancia y el síndrome de abstinencia opioide (28). Sin embargo, el empleo de IFN- α en los bioensayos farmacológicos típicos de los opioides, muestra la carencia de un efecto mediado a través de algún tipo de receptor opioide (89).

En el presente estudio, utilizando la técnica de patch-clamp la cual determina con muy alta precisión los efectos de cualquier fármaco sobre las corrientes iónicas y por ende sobre los flujos de iones (48); se mostró que el IFN- α , no modifica las corrientes de Na⁺, ni las de K⁺. Contrariamente, las corrientes correspondientes a los flujos del ion Ca²⁺, se mostraron afectadas por la citokina. Esta observación conlleva a postular como mecanismo de acción para el IFN- α a la modificación de la permeabilidad de la membrana hacia el ion Ca²⁺. Un efecto de esta naturaleza, definitivamente provocaría cambios en la excitabilidad celular, además de cambios de más larga duración, incluyendo a la potenciación celular (32,73).

Aunque el IFN- α modificó las corrientes de calcio en prácticamente todos los niveles de voltaje utilizados (de -40 a +30 mV), su efecto fue más intenso sobre las corrientes generadas con voltajes elevados; es decir en aquellas corrientes registradas cuando el potencial de membrana fue mayor a 0 mV. En otras palabras, la acción más significativa de esta citokina sobre la corriente de Ca²⁺, parece ser sobre las corrientes tipo HVA. Estas corrientes son mediadas en algunas células cerebrales por al menos 2 tipos de canales denominados N y L. El segundo tipo de ellos, es sensible a dihidropiridinas (62) y parece ser el canal involucrado en los procesos de liberación de neurotransmisores y posiblemente en los

efectos crónicos de las neurotrofinas (12). Esto sugeriría la posibilidad de que los efectos desencadenados por el IFN- α en el presente estudio sean resultado de una interacción entre esta citokina y estos tipos de canal. Sin embargo, con estos resultados no es posible establecer el mecanismo de tal interacción a nivel de membrana celular. Así, se desconoce si los efectos del IFN- α son consecuencia de una unión directa a canales que generan corrientes tipo HVA, o se trata de un efecto mediado por un algún sistema de transducción intracelular.

La interacción directa entre el canal y el IFN- α es apoyada por las características de los resultados aquí encontrados. Por ejemplo, el tiempo durante el cual se manifestó este efecto fue de larga duración e incluso persistió tiempo después de retirar el IFN- α por el lavado de la preparación (Fig 14). Esto sugiere una acción sobre canales que participan en procesos de regulación intracelular de larga duración como es el caso de ambos tipos canales de calcio. Estos tipos de canales están involucrados en la regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} libre, la cual constituye el pivote que dispara una gran cantidad de fenómenos intracelulares, tales como la contracción muscular y la secreción celular entre otros (24). La modificación crónica de esta concentración intracelular de Ca^{2+} , la cual es inducida por varios neurotransmisores y por las neurotrofinas, provoca cambios en la diferenciación y desarrollo celular (12). Coincidentalmente estos fenómenos también son modificados por las citokinas, entre las que se encuentra al IFN- α (73,90).

Independientemente del mecanismo utilizado, estos resultados sugieren que la citokina modula la concentración intracelular del ion Ca^{2+} , con lo cual tendría un acceso hacia los procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación neuronal; además de los mecanismos involucrados en la comunicación interneuronal de las estructuras sensibles a sus efectos, tal como el HL. Gracias a esta acción el IFN- α modularía además los procesos de la sinapsis neuronal, quizá regulando la liberación de los neurotransmisores o modificando la excitabilidad neuronal hacia ellos. Estos hallazgos en su conjunto, le otorgan al IFN- α un papel fisiológico sobre el control de funciones tales como la ingesta de alimento, el peso corporal y el aumento en la temperatura corporal, las que son reguladas

por las células de esta estructura del SNC.

Como plan de trabajo a futuro; es necesario primero, analizar la dinámica y la especificidad de los efectos del IFN- α sobre las corrientes de Ca²⁺. Para ello, es necesario utilizar herramientas farmacológicas y procedimiento electrofisiológicos tales como caracterizar los parámetros eléctricos de activación e inactivación, los cuales nos permitan establecer de manera exacta y puntual, el tipo de canal de Ca²⁺ que está involucrado en los efectos de esta citokina. En el caso de las neuronas del HL, donde aún se desconocen el tipo y características eléctricas de los canales de calcio ahí localizados, es necesario determinar el tipo de corrientes de Ca²⁺ existentes y posteriormente analizar el efecto del IFN- α sobre cada uno de los canales de Ca²⁺ presentes en esta estructura. Como segundo punto, es necesario el definir el mecanismo de acción a nivel de membrana celular. En éste, es de particular importancia el analizar la participación de los sistemas de proteínas G, las cuales están involucradas en la mayoría de los mecanismos de regulación de Ca²⁺ intracelular (12).

CAPITULO 6. CONCLUSIONES.

- A) El IFN- α induce efectos sobre la actividad eléctrica de las neuronas del HL, los cuales se manifiestan como cambios en la frecuencia de descarga neuronal.
- B) Los efectos de esta citokina sobre la excitabilidad neuronal, son consecuencia de su interacción con la membrana celular.
- C) El IFN- α modifica además la respuesta de la membrana celular hacia otros neurotransmisores como el GLUT y el GABA. Por un mecanismo que involucra un cambios en la actividad eléctrica de la membrana postsináptica. Este efecto mostró una dinámica tal que excluye la acción de un efecto genómico .
- D) El IFN- α disminuye las corrientes de Ca^{2+} de tipo LVA y HVA, presentes en la membrana de estas neuronas.
- E) Estos resultados indican que el IFN- α está involucrado en los procesos de regulación de las funciones de esta neuronas a través de una acción directa sobre los flujos del ion Ca^{2+} y de la concentración intracelular del mismo.
- F) Todos estos efectos fueron obtenidos utilizando concentraciones de IFN- α las cuales se encuentran en el rango fisiológico. Esto indica que esta citokina juega un papel importante tanto en las manifestaciones neurológicas, consecuencia de infecciones o tumores, como también en situaciones fisiológicas.

CAPITULO 7. REFERENCIAS.

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. Cellular and molecular immunology. Second Edition. Saunders Company eds. USA. pp. 517. 1995.
2. Abbott, R.J., Bolderson, I., Gruer, P.J.K. Assessment of an immunoassay for interferon- α in cerebrospinal fluid as a diagnostic aid in infections of the central nervous system. *J. Infect. Dis.* 15:153-160. 1987.
3. Adams, F., Quesada, J.R., Gutterman, J.V. Neuropsychiatric manifestations of human leukocyte interferon therapy in patients with cancer. *JAMA.* 252:938-941. 1984.
4. Alheim, K. et al. Interleukin-1 expression is inducible by nerve growth factor in PC-12 pheochromocytoma cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:9302-9306. 1991.
5. Anand, B.K., Brobeck, J.R. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 77:323-324. 1951.
6. Auguet, M. High affinity binding of 125 I-labelled mouse interferon to specific cell surface receptors. *Nature.* 284:459-461. 1980.
7. Ban, T. Fiber connections in the hypothalamus and some autonomic functions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 3. Suppl. 1:3-13. 1975.
8. Banks, W.A., Kastin, A.J., Durham, D.A. Bidirectional transport of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. *Brain Res. Bull.* 23:433-437. 1989.
9. Barr, M.L., Kierman, J.A. Hypothalamus. En: Barr, M.L., and Kierman, J.A. (eds.). *The human nervous system.* N.Y. Harper & Row. pp. 119-190. 1986.
10. Benveniste, E.T. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources function and mechanism of action. *Am. J. Physiol.* 263 (Cell Physiol. 32):C1-C16. 1992.
11. Bernardis, L.L., Bollinger, L.L. The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17(2):141-193. 1993.
12. Berninger B., Garcia, D.E., Inagaki, N., Hahnel, C. and Lindholm, D. BDNF and NT-3 induce intracellular calcium elevation in hippocampal neurons. *Neuroreport.* 4(12):1303-1306. 1993.
13. Billiau, A. The interferon system as a basis for antiviral therapy or prophylaxis. *Antiviral Res.* 1:131-140. 1985.
14. Billingham, M.E.J. Cytokines as inflammatory mediators. *Br. Med. Bull.* 43:350-370.

1987.

15. Blalock, J.E. A molecular basis for bidirectional communication between the Immune and Neuroendocrine systems. *Int. J. Neurosci.* 38:455-464. 1988
16. Blalock, J.E., Smith, E.M. Human leukocyte interferon (HuIFN- α): Potent endorphin-like opioid activity. *Biophys. Res. Commun.* 101:472-478.1981.
17. Blatteis, C.M., Quan, N., Howell, R.D. The organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) is critical for fever induced in guinea pigs by blood-borne cytokines. *Soc. Neurosci. Abstr.* 15:718. 1989.
- 17a. Bocci, V. I. Pharmacokinetic studies of Interferons. *Pharmacol. Ther.* 13(3):421-440. 1981.
18. Breder, C.D., Dinarello, C.A., Saper, C.B. Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science.* 240: 321-324. 1988.
19. Browning, J. Interferons and rheumatoid arthritis: insight into interferon biology. *Immunol. Today.* 8:372-377. 1995
20. Calvet, M.C., Gresser, I. Interferon enhances the excitability of cultured neurons. *Nature.* 278:558-560. 1989.
21. Camargo, L.A.Saad, W.A., Machado, J.A. Effects of noradrenergic stimulation of the medial and lateral hypothalamus on cardiovascular response. *Pharmacol. Res. Comm.* 11:147-156. 1979.
22. Clemens, M.J., Cytokines. Read A.P. and Brown T. (eds.) First Edition. Bios Scientific Publishers, Oxford. p.p. 121. 1991.
23. Code, R.A., Seroogy, K.B., Fallon, J.H. Some transforming growth factor-alpha connections and their colocalization with enkephalin in the rat central nervous system. *Brain Res.* 421:401-405. 1987.
24. Cooper, J.R., Bloom, F.E., Roth,R.H. The biochemical basis of neuropharmacology. Sixth Edition. Oxford University press. 4th edition. New York. p.p. 454. 1992.
25. Cosman, D., Lyman, S.D., Idzerda, R.L., Beckmann, M.P., Park, L.S., Goodwin, R.G., March, C.J. A new cytokine receptor super family. *Trends Biochem. Sci.* 15(7):265-270. 1995.
26. Dafny, N. Interferon modifies EEG and EEG-like activity recorded from sensory, motor and limbic system structures in freely behaving rats. *Neurotoxicol.* 4:235-240. 1983.
27. Dafny, N. The hypothalamus exhibits electrophysiologic evidence for morphine tolerance and dependence. *Exp. Neurol.* 77:66-67.1982.

28. Dafny, N., Lee, J.R., Dougherty, P.M. Immune response products alter CNS activity: interferon modulates central opioid functions. *J Neurosci. Res.* 19:130-139. 1988.
29. Dafny, N., Prieto-Gómez, B., Reyes-Vázquez, C. Does the immune system communicates with the central nervous system?: interferon modifies central nervous activity. *J. Neuroimmunol.* 9:1-13. 1985.
30. Dainiak, N. Cell membrane family of growth regulatory factors. *Prog. Clin. Biol. Res.* 352:49-61. 1994.
31. Dinarello, C.A. Multiple biological properties of recombinant human interleukin-1 beta. *Immunobiol.* 172:301- 315. 1986.
32. Dinarello, C.A., Mier, J.W. Current concepts. Lymphokines. *New J. Med.* 317, (15): 940-945. 1987.
33. Dinarello, C.A., Wolff, S.M. Mechanisms of disease. The role of interleukin-1 in disease. *New J. Med.* 328(2):106-113. 1993.
34. Edwards, F.A., Konnerth, A., Sakmann, B., Takahashi, T. A thin slice preparation for patch-clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflügers Arch.* 414:600-612. 1989.
35. Farrar, W.L., Kilian, P.L., Ruff, M.R., Hill, J.M., Pert, C.B. Visualization and characterization of interleukin-1 receptors in brain. *J. Immunol.* 139:459-463. 1987.
36. Fent, K., Zbinden, G. Toxicity of interferon and interleukin. *Trends Pharmacol. Sci.* 8:100-105. 1987.
37. Fisher, P.B., Grant, S. Effects of interferon on differentiation of normal and tumor cells. *Pharmacol. Ther.* 27(2):143-166. 1985.
38. Fisher, P.B., Prignoli, D.R., Herms, H., Weinstein, I.B., Postka, S. Effects of combined treatment with interferon and mezerein on melanogenesis and growth in human melanoma cells. *J. Interferon Res.* 5(1):11-22. 1985.
39. Fontana, A. et al. In *Clinical applications of cytokines: Role in pathogenesis, Diagnosis and Therapy.* Oppenheim, J.J., Rossio, J.L. and Gearing, A.J.H., (eds.), p.p. 357-366, Oxford University Press. 1993.
40. Fontana, A., Weber, E., Dayer, J.M. Synthesis of interleukin-1 endogenous pyrogen in the brain of endotoxin treated mice. *J. Immunol.* 133:1696-1698. 1984.
41. Frei, K., Leist, J., Bodmer, S., Schwerdel, C. and Fontana, A. Astrocytes of the brain synthesize interleukin 3-like factors. *J. Immunol.* 135:4044-4047. 1985.

42. Gatti, S., Bartfai, T. Induction of tumor necrosis factor- α mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. *Brain Res.* 624: 291-294. 1993.
43. Giulian, D., Baker, T.J., Shih, L.C. and Lachman, L.B. Interleukin-1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J. Exp. Med.* 164:594-604. 1986.
44. Goldstein, D., Laszlo, J. Interferon therapy in cancer: from imaging on to interferon. *Cancer Res.* 46:4315-22. 1986
45. Greiner, J.W., Fisher, P.B., Pestka, S., Schlom, J. Differential effects of recombinant human leukocyte interferons on cell surface antigen expression. *Cancer Res.* 46(10): 4984-4990. 1986.
46. Greiner, J.W., Hand, P.H., Noguchi, P., Fisher, P.B., Pestka, S., et al. Enhanced expression of surface tumor-associated antigens on human breast a colon tumor cells after recombinant human leukocyte alpha-interferon treatment. *Cancer Res.* 44(8):3208-3214. 1986.
47. Grossberg, S.E., Keay, S. The effects of interferon on 3T3-L1 cell differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 350:294-300. 1980.
48. Hamill, O.P., Marty, A. Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell-free membrane patches. *Pflüger Arch.* 391:85-100. 1981.
49. Hillhouse, E.W., Mosley K. Peripheral endotoxin induces hypothalamic immunoreactive interleukin-1 in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 109:289-290. 1993.
50. Hori, T., Nakashima, T., Take, S., Kaisuka, Y., Mori, T., Katafuchi, T. Immune cytokines and regulation of body temperature food intake and cellular immunity. *Brain Res. Bull.* 27:309-313. 1991.
51. Isaacs, A., Lindermann, J. Virus Interference. The interferon. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 147:258-267. 1957.
52. Johnson, H.M., Bazer, F.W., Szente, B.E., Jarpe, M.A. How interferon fight disease. *Scientific American.* May: 40-47. 1994.
53. Jordan, F.L., Thomas, W.E. Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res. Rev.* 13:165-178. 1988.
54. Joseph, S.A., Knigge, K.M. The endocrine hypothalamus: Recent anatomical studies. *Res Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 56:15-47.1978.
55. Kerkut, G.A., Wheal, H.V. Electrophysiology of isolated mammalian CNS preparations.

- Kerkut G.A. and Wheat H.V. (eds). Academic press. New York. pp. 1-153. 1981.
56. Kiefer, R., Kreutzberg, G.W. Gamma interferon-like immunoreactivity in the rat nervous system. *Neurosci.* 37:725-734. 1990.
 57. König, J.F.H., Klippel, R.A. The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. The Williams and Wilkins (eds.), Waverly press. Baltimore. pp.162. 1963.
 58. Leibowitz, S.F., Reciprocal hunger-regulating circuits involving ventromedial and lateral hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 67:1063-1070. 1970.
 59. Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., Altar, C.A., Distefano P.S. Neurotrophic factors: from molecule to man. *TINS.* 17(5):182-190. 1994.
 60. Ljungdahl, A. Olsson, T. Van der Meide, P.H., Holmdahl, R., Klareskog, L., Höjeberg. Interferon-like immunoreactivity in certain neurons of the central and peripheral nervous system. *J. Neurosci. Res.* 24:451-456. 1989.
 61. Lodmell, D.L., Weidbrauk, D.L. and Ewall, L.C. Interferon induced within the central nervous system during infection is inconsequential as a mechanism responsible for murine resistance to street rabies virus. *J. Gen. Virol.* 70:473-478. 1989.
 62. McCleskey, E.W. Calcium channels: cellular roles and mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4:304-312. 1994.
 63. Mehler, M.F., Rozental, R., Dougherty, M., Spray, D.C., Kessler, J.A. Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Nature.* 362:62-65. 1993.
 - 63a. Miller, L.G., Galpern, W.R., Dunlap, K., Dinarello, C.A., Turner, T.J. Interleukin-1 augments γ -aminobutyric acid_A receptor function in brain. *Mol. Pharmacol.* 39:105-108, 1991.
 64. Muramami, N. et al. Bacterial lipopolysaccharide-induced expression of interleukin-6 messenger ribonucleic acid in the rat hypothalamus, pituitary, adrenal gland, and spleen. *Endocrinol.* 133:2574-2578. 1993.
 65. Nagata, S. Stress-induced immune changes and brain-immune interaction. *Dagaku Zasshi.* 15:161-171. 1993.
 66. Nakamura, A., Kohsaka, T., Johns, E.J. Stimulation of α -adrenoceptors induces production of IL-6. *J. Hypertens.* 11:491-497.1993.
 67. Nakashima, T., Hori, T., Kiyohara, T. Naloxone blocks the interferon- α induced changes in hypothalamic neuronal activity. *Neurosci. Lett.* 82:332-336. 1987.

68. Orr, E.L., Nervous-system-associated mast cells: Gatekeepers of neural and immune interactions. *Drug. Dev. Res.* 15:195-205. 1988.
69. Ortaldo, J.R., Herberman, R.B., Harvey, C., Osheroff, P., Pan, Y.C. et al. A species of human alpha interferon that lacks the ability to boost human natural killer activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 18(15):4926-4929. 1984.
70. Owens, T., Renno, T., Taupin, V., Krakowski, M. Inflammatory cytokines in the brain: does the CNS shape immune responses?. *Immunol. Today.* 15(12): 566-571. 1994.
71. Pardoll, D.M. Cancer vaccines. *Immunol. Today.* 14(6):310-316. 1993.
72. Pardridge, W.M. Neuropeptides and the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Physiol.* 45:76-82. 1983.
73. Patterson, P.H., Nawa, H. Neuronal differentiation factors/cytokines and synaptic plasticity. *Cell.* 72:123-137. 1993.
74. Pellegrini, S., Schindler, C. Early events in signaling by interferons. *Trends Biol. Sci.* 18:338-342. 1993
75. Pestka, S., Baron, S. Definition and classification of the interferons. *Methods Enzymol.* 78:3-14. 1981.
76. Pestka, S., Kelder, B., Rehberg, E., Ortaldo, J.R., Herberman, R.B. et al. In: *The biology of the interferon system.* ed. DeMaeyer, E., Schelleken. Amsterdam: Elsevier, pp.535-549. 1984.
77. Pfeffer, S.R., Rothman, J.E. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and golgi. *Ann. Rev. Biochem.* 56:829-852. 1987.
78. Plata-Salamán, C.R. Immunoregulators in the nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15(2):185-215. 1991.
79. Plata-Salamán, C.R. Interferons and central regulation of feeding. *Am. J. Physiol.* 263(32): R1222-R1227. 1992.
80. Plata-Salamán, C.R., Oomura, Y., Kai, Y. Tumor necrosis factor and interleukin-1 α : suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Res.* 448:106-114. 1988.
81. Prieto-Gómez, B., Reyes-Vázquez, C., Dafny, N. Differential effects of interferon on ventromedial hypothalamus. *J. Neurosci. Res.* 10:273-278. 1983.
82. Raissdana, S.S., Barish, M.E., Mandorf, N.B., Kerlin, J. α -interferon promotes maturation of mammalian neurons in culture. *Soc. Neurosci. Abstr.* 15:18. 1989.

ESTA COPIA NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

83. Reyes-Vázquez, C., Dafny, N. Three different types of alpha interferons alter naloxone-induced abstinence in morphine addicted rats. *Immunopharmacol.* 9:349-355. 1985.
84. Reyes-Vázquez, C., Mendoza-Fernandez, V., Herrera-Ruiz, M., Dafny, N. Interferon- α modulates glucose sensitive neurons in the hypothalamus. In press.
85. Reyes-Vázquez, C., Prieto-Gómez, B., Dafny, N. Novel effects of interferon on the brain: microiontophoretic application and single cell recording in the rat. *Neurosci. Lett* 34:201-206.1982.
86. Reyes-Vázquez, C., Prieto-Gómez, B., Dafny, N. Alpha and Gamma interferon's effects on cortical and hippocampal neurons: Microiontophoretic application and single cell recordings. *Int. J. Neurosci.* 25:113-121. 1984.
87. Reyes-Vázquez, C., Prieto-Gómez, B., Dafny, N. Alpha-interferon suppresses food intake and neuronal activity of the lateral hypothalamus. *Neuropharmacol.* 33(12):1545-1552. 1994.
88. Reyes-Vázquez, C., Prieto-Gómez, B., Dafny, N. Stress-induced alterations in interferon production and effects on central nervous system. *Intern. Brain Immun.* 6:154-164. 1992.
89. Reyes-Vázquez, C., Weisbrodt, N., Dafny, N. Does interferon exert its action through opiate receptors?. *Life Sci.* 35:1015-1021. 1985.
90. Rothwell, N.J., Reiton, J.K. Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17(12): 217-227. 1993.
91. Roitt, I. *Essential Immunology*. Seventh Edition. Blackwell Scientific Publications eds. Oxford. London. pp. 687. 1990.
92. Rohatiner, A.Z.S., Prior, P.I., Burton, A.C., Smith, A.T., Balkwill, F.R., Lister, T.A.S. Central nervous system toxicity of interleron. *Br. J. Cancer.* 47:419-422. 1983.
93. Scott, G.M., Secher, D.S., Flowers, D., Bate, J., Cantoll, K., Tyrrell, D.A.J. Toxicity of interferon. *Br. Med. J.* 282:1345-1348. 1981.
94. Sen, G.C. and Lengyel, P. The interferon system. *J. Biol. Chem.* 267(8): 5017-5020. 1992.
95. Van Gool, J. et al. Systemic administration of adrenaline induce production of IL-6 in nerve cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 57: 200-210. 1993.
96. Wekerle, H., Sun, D., Oropeza-Wekerle, R.L., Meyermann, R. Immune reactivity in the nervous system: Modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J. Exp. Biol.* 132:43-57. 1987.

97. Wright, E.M., Saito, Y. The choroid plexus as a route from blood to brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 481:214-220. 1986.
98. Zoon, K.C., Smith, M.E., Bridgen, P.J. and Anfinsen, C.B. Amino terminal sequence of the major component of human lymphoblastoid interferon. *Science.* 207:527-528. 1980.
99. Zoon, K.J., Smith, M.E., Bridgen, P.J., Nedden, D.Z. and Anfinsen, C.B. Purification and partial characterization of human lymphoblastoid interferon. *Proc. Acad. Sci. USA.* 76:5601-5605. 1979.