

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

34
2EJ

"ANALISIS DE LA ACCION MODULADORA DEL
INTERFERON- α SOBRE LA EXCITABILIDAD DE
LAS NEURONAS DE HIPOTALAMO LATERAL"

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

PATRICIA DE JESUS PEREZ ARELLANO

DIRECTOR DE TESIS:
Q.F.B. ENRIQUE CALDERON GARCIA

MEXICO, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*Gracias Señor, por brindarme ésta
y un sin fin de bendiciones.*

*A mis padres Héctor y Antonia, con todo mi corazón,
porque gracias a su inmenso amor, esfuerzo y comprensión
he llegado a ser lo que soy.*

*A mi hermana Eva, mi compañera y amiga de toda la vida,
quien me apoya día a día.*

*A mi tía Amanda con cariño, por contar siempre
con su presencia y apoyo.*

*A la Universidad La Salle, a mis profesores y asesores,
gracias por contribuir a mi formación humana y profesional.*

*A Miriam y Rosa, por su gran amistad
y por recorrer el camino juntas.*

A todos mis familiares y amigos, que tuvieron confianza en mi.

*Con mi especial agradecimiento, admiración y respeto
al Dr. Cruz Reyes Vázquez, por su excelente
dirección y generoso apoyo en la realización de este
trabajo, quien además con su amplia e inteligente
visión, me indujo a vislumbrar un futuro prometedor y
a obtener la seguridad para lograrlo, y se convirtió en
un amigo para siempre.*

*A la Dra Elia y a mis compañeros de
laboratorio, por su ayuda y por los momentos que
compartimos juntos.*

Este trabajo se realizó en el laboratorio de citocinas del departamento de Fisiología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Cruz Reyes Vázquez.

INDICE	Página
CAPITULO I. INTRODUCCION	1
1.1 Descripción general de citocinas	1
1.2 Estructura y clasificación del IFN	1
1.3 Síntesis de IFN	3
1.4 Mecanismos de inducción del IFN	4
1.5 Receptores al IFN	4
1.6 Acciones biológicas del IFN	6
1.7 IFN en clínica	8
1.8 Toxicidad del IFN	8
CAPITULO II. ANTECEDENTES	10
2.1 Evidencias de la relación del IFN con el Sistema Nervioso Central	10
CAPITULO III.	
3.1 Planteamiento del problema	21
3.2 Objetivos	21
3.3 Hipótesis	21
CAPITULO IV. MATERIALES Y METODOLOGIA	22
4.1 Material biológico	22
4.2 Material quirúrgico	22
4.3 Material básico	22
4.4 Reactivos	22
4.5 Soluciones	23
4.6 Equipo	23
4.7 Preparación del corte de tejido	26
4.8 Preparación de micropipetas	26
4.9 Registro de la actividad unitaria extracelular	27
4.10 Registro de fijación de voltaje en porciones de membrana (Patch-clamp)	28
4.11 Manejo de datos	30
CAPITULO V. RESULTADOS	31
CAPITULO VI. DISCUSION	42
CAPITULO VII. CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFIA	46

CAPITULO I. INTRODUCCION

1.1. Descripción general de Citocinas

El sistema inmune produce una variedad de sustancias químicas que participan en la coordinación de los mecanismos de defensa y reparación del organismo. La cooperación celular para inducir una respuesta inflamatoria, es mediada por un grupo importante de péptidos a los que se les ha dado el nombre de Citocinas (20). Dentro de este grupo, el primer compuesto descrito fue el interferón (IFN) descubierto por Isaacs y Lindenmann en 1957, cuando observaron que un extracto de células expuestas al virus inactivado de la gripe, convertía en resistentes a otras células para un segundo virus. La explicación de esta observación sugería la existencia de un factor antiviral en el extracto que interfería con la replicación viral; más tarde este factor se identificó y denominó **Interferón (IFN)**(36).

1.2 Estructura y clasificación del IFN

Los Interferones son un grupo de proteínas divididas en 3 diferentes clases de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, biológicas y al tipo celular que las produce:

IFN- α

El interferón- α o leucocitario, producto primordialmente de leucocitos, es un grupo de péptidos con peso molecular aproximado a 19 000 Da (55). En el hombre existen dos subclases de IFN- α (17), los cuales son producto de al menos 24 genes, 18 de ellos codifican para los IFN- α subclase 1, proteínas de 165-166 aminoácidos; y 6 genes que intervienen en la producción de IFN- α subclase 2, los cuales constituyen proteínas de 172 aminoácidos (17) (cuadro 1). (Fig. 1)

IFN- β

El IFN- β es una citocina secretada principalmente por los fibroblastos (17). Es un péptido de 166 aminoácidos con peso molecular aproximado a los 20,000 Da (55) producto de un solo gen, por lo que carece de subclases; aunque posee una gran homología en su secuencia de aminoácidos con el IFN- α , por lo que es posible que ambos deriven de un mismo antecesor. Debido a esta similitud estructural e inmunológica, el IFN- α y el IFN- β se agrupan en una familia conocida como IFN tipo I. Esta familia también incluye a otros tipos de IFN descubiertos recientemente: el IFN- ω y el IFN- τ (74) (cuadro 1).

IFN- γ

El interferón- γ o inmune (IFN- γ), es producto de la secreción de linfocitos T sensibilizados, de células citotóxicas inmunológicas (NK, Natural Killer) así como de neutrófilos polimorfonucleares (11); es un péptido de 135-136 aminoácidos, con un peso molecular cercano a 15,000 Da (41,55). Esta citocina es producto de un solo gen y carece de homología estructural con alguno de los otros IFNs descritos hasta ahora. Por esta razón este IFN es el único integrante de la familia de IFN tipo II (cuadro 1).

Cuadro No.1 Clasificación y propiedades de los IFNs

	TIPO I	TIPO II
CLASES	Alfa y beta	Gamma
OTRAS CLASES	Tau y omega	Ninguno
ESTRUCTURA	Una cadena de aminoácidos	Dos cadenas idénticas de aminoácidos
PRODUCTORES PRINCIPALES	Casi cualquier célula infectada por virus produce el IFN- α ; los fibroblastos producen IFN- β	Linfocitos T y células NK
EFFECTOS PRINCIPALES	En células infectadas induce la producción de proteínas que inhiben la replicación viral y celular	Activa a los componentes del sistema inmune para erradicar tumores e infecciones en células

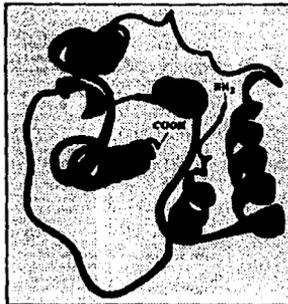


Fig. 1. Representación esquemática de una molécula de IFN- α humano. Esta estructura corresponde a una de las 18 subclases que conforman al IFN- α subclase 1.

1.3 Síntesis de IFN

Los IFNs α , β y γ , son producto principalmente de células inmunes como los leucocitos, fibroblastos y linfocitos T; respectivamente (55,56). La presencia de citocinas en el SNC puede obedecer a una síntesis por parte de las células de glía (22,56), o a una alteración en la barrera hematoencefálica, como ocurre en las lesiones y procesos patológicos del SNC. Además, se encontró la presencia de una inmunoreactividad al IFN- γ , en algunas terminales nerviosas y cuerpos celulares del cerebro de rata (40). Esto es indicativo de una síntesis local por parte de elementos neuronales. Recientemente se mostró que los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) tienen la capacidad de sintetizar y liberar entre otro tipo de citocinas al IFN- α (11). En general, todas las células del organismo son capaces de producir IFN tipo I, mientras que el IFN tipo II solamente es sintetizado por linfocitos T y células naturales asesinas (NK, Natural Killer cells) (Fig 2).

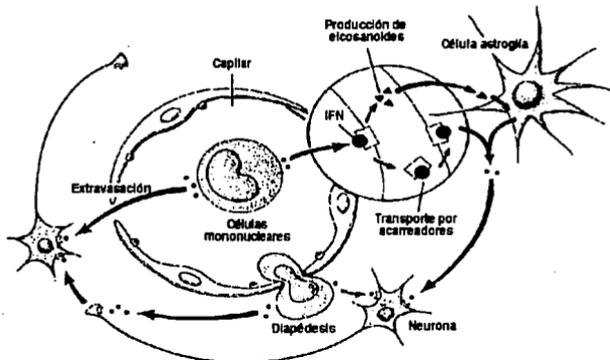


Fig. 2. Se proponen diferentes mecanismos por los cuales el IFN aumenta su concentración dentro del SNC. En términos generales estos mecanismos implican procesos de extravasación, diapédesis y síntesis local.

Las concentraciones de citocinas cerebrales tienden a incrementarse durante las enfermedades neurológicas. Por ejemplo, los niveles de IFN- α se aumentan en pacientes infectados con virus de la rubéola, citomegalovirus pneumonia y el virus HIV-1 (1,46).

1.4 Mecanismos de inducción del IFN.

En condiciones normales, los interferones se secretan en cantidades apenas cuantificables; sin embargo, la exposición a varios agentes inducen su producción y liberación en niveles más elevados. Estos agentes reciben el nombre de inductores del interferón. Los virus son los inductores naturales más importantes para la síntesis de IFN- α e IFN- β seguidos de las bacterias, detritus bacterianos y micóticos, ácidos nucleicos naturales y sintéticos de doble cadena, varios polímeros, sustancias de bajo peso molecular, y algunos mitógenos (17). La inducción de la producción de IFN es específica de especie y de tipo celular. En el caso del IFN- γ , éste incrementa su producción por acción de inductores del tipo de bacterias, virus, macrófagos y detritus celulares. (Fig. 3)

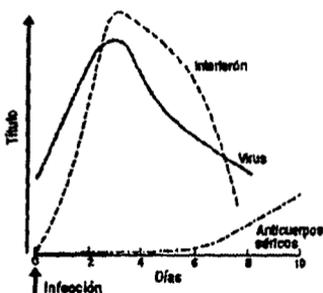


Fig. 3. Cuando se inicia un proceso infeccioso, la producción de IFN se relaciona temporalmente con los títulos del virus, mientras que la producción de anticuerpos aparece hasta que las concentraciones se reducen.

1.5 Receptores al IFN

Gracias a la disponibilidad de interferones obtenidos por técnicas de recombinación genética, y al desarrollo de procedimientos de marcado radiactivo, se ha detallado el mecanismo de acción del IFN.

A principios de los 70's, se sugirió que el IFN se asociaba en forma específica con algún sitio de la superficie celular. Pero no fue hasta el año de 1980, cuando Aguet presentó evidencias de una unión de alta afinidad entre el IFN- α y un receptor específico en la superficie celular. Esta asociación es la primer etapa en el mecanismo de acción de esta citocina (4). Sin embargo, poco después se describió la existencia de efectos tanto hormonales como conductuales del IFN- α , los cuales se ejercían en estructuras que carecían del tipo de receptores descritos

por Aguet. Así, se mostró que el IFN- α desplazaba de sus sitios de unión a la 3 [H]-morfina; además de que indujo efectos similares a los opioides. Esto sugirió, una posible interacción entre el IFN- α y receptores opioides del tipo μ (8), aunque tal aseveración, no fue confirmada (64). Sin embargo, se han descrito múltiples efectos de estos interferones los cuales ocurren en tejidos que carecen de receptores típicos similares a los hasta ahora descritos.

Actualmente se considera, que las acciones inmunológicas de los IFNs ocurren gracias a la existencia de receptores específicos de superficie, los cuales se encuentran distribuidos en varios tipos de células, principalmente de tipo inmunológico (55). Hasta ahora se han descrito 2 tipos de receptores al IFN, los cuales se asocian a un sistema de transducción membranal similar. Debido a su homología estructural, el IFN- α y el IFN- β compiten por el mismo sitio receptor, mientras que el IFN- γ se une al otro tipo (74). Estructuralmente, estos receptores son glicoproteínas con un peso molecular de aproximadamente 130 y 117 KDa, para los interferones de tipo I y tipo II, respectivamente (55).

La interacción de los IFNs con su receptor, induce la transcripción de una serie de genes relacionados que codifican la síntesis de una misma proteína, la cual juega un papel importante en la expresión molecular de sus efectos y respuestas biológicas. El proceso de transducción intracelular gracias al cual el IFN modifica la actividad nuclear celular, ha sido descrito recientemente (37,54). Este proceso implica la activación de dos tipos de quinasas, una quinasa de la tirosina y un nuevo tipo de quinasa denominada quinasa Janus en honor al dios de la mitología romana, Janus, un personaje que poseía dos caras (37). Cuando estas quinasas son activadas por la unión del IFN a su receptor, éstas inducen la fosforilación de otro conjunto de proteínas citoplasmáticas denominadas STAT (proteínas transductoras de la señal y activadoras de la transcripción), quienes a su vez se unen a una proteína de 48 KDa, para formar un complejo proteínico que a nivel del núcleo celular se une a un promotor genético (ISRE), el cual controlará la iniciación de la transcripción (Fig. 4).

1.6 Acciones biológicas del IFN

A partir de su descubrimiento, el interferón ha mostrado tener una gran variedad de propiedades. La primera en describirse y tal vez la más conocida sea su capacidad de interferir con la replicación viral. Esta propiedad la poseen todas las clases de IFN, aunque el grado de actividad varía entre ellas. (Fig. 5).

Actualmente los efectos descritos para estas citocinas, competen no sólo al campo de la inmunología, sino que se encuentran prácticamente en cada uno de los órganos y sistemas del organismo.

Las acciones inmunomoduladoras ejercidas por los IFNs son las siguientes (6,17,41,55,56):

- Aumento de la fagocitosis por la activación de macrófagos tisulares y humorales
- Aumento de la citotoxicidad de linfocitos T sensibilizados
- Aumento de la expresión de antígenos de superficie
- Aumento de la citotoxicidad de las células NK
- Maduración de linfocitos B para activar la síntesis de inmunoglobulinas

• Actividad antineoplásica

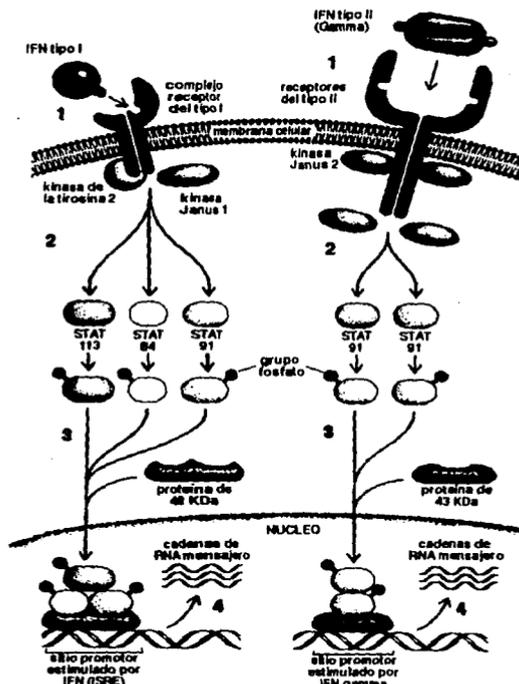


Fig. 4. Modelo esquemático del mecanismo transmembranal que utiliza el IFN para ejercer sus efectos inmunomoduladores. En este mecanismo intervienen dos quinasas de la tirosina y un conjunto de proteínas plasmáticas, descritas como STAT las cuales al asociarse con una proteína nuclear modulan el proceso de transcripción génica.

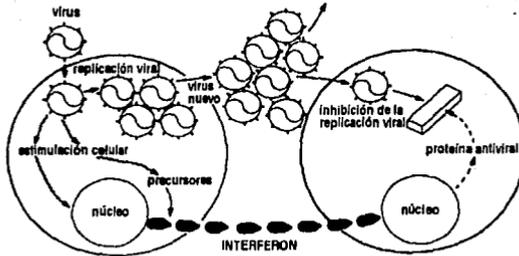


Fig. 5. Los efectos de interferencia viral provocados por el interferon- α , se ejercen en células que han sido infectadas por un virus. Estos constan de un mecanismo genómico que actuando al nivel del núcleo celular impiden la replicación del virus.

En particular, su actividad antineoplásica fue ampliamente analizada en virus oncogénicos para determinar su potencialidad terapéutica. Los resultados mostraron que los IFN's inhiben la producción y transformación de tumores causados por este tipo de virus (29). Sin embargo, trabajos posteriores mostraron que los IFN's también inhiben el crecimiento de tumores que carecen de una etiología viral clara.

También los IFN's ejercen efectos no relacionados directamente con el sistema inmune. Muchos de éstos implican procesos de diferenciación celular y modulación de algunos factores de crecimiento celular, como es el caso de las células del miocardio. En estas células la adición de IFN provoca un incremento en su frecuencia de latido y fuerza de contracción, lo que representa un efecto sobre procesos de diferenciación miocárdica (10).

Sobre el sistema endócrino, el IFN- α induce la liberación de cortisol de las glándulas adrenales (65) y el IFN- γ induce la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF, Corticotrophin Releasing Factor) (38,43), y como consecuencia también induce la secreción de hormona adrenocorticotrópica (ACTH, AdrenoCorticoTrophin Hormone) (7).

Las células del sistema nervioso también pueden verse afectadas por la acción de esta citocina. Así, el IFN- α inhibe intensamente la proliferación de astrocitos (34); contrariamente, el IFN- γ promueve la maduración de neuronas en cultivo de ratón (59). Además, esta citocina también tiene la capacidad para inducir la maduración de astrocitos en las

etapas iniciales del desarrollo de la médula espinal en humanos (22). Se desconoce el significado de estos efectos antagonistas entre ambos IFNs. Otro estudio mostró que las tres clases de IFNs pueden prevenir la muerte neuronal inducida por la privación del factor de crecimiento neuronal (12).

1.7 IFN en clínica

Inicialmente se utilizaron preparaciones crudas de IFNs en los ensayos clínicos para el tratamiento de enfermedades virales y tumorales, las cuales se obtenían de ultrafiltrados sanguíneos. Actualmente, las preparaciones de IFN- α que se utilizan son de origen recombinante y se utilizan en enfermedades hematológicas, oncológicas y virales (44).

La leucemia de células falciformes fue una de las primeras enfermedades malignas en la cual el IFN- α recombinante tuvo éxito en su total remisión (67) por lo que, actualmente esta citocina constituye el tratamiento de elección para este mal. Su acción antiproliferativa en otras enfermedades no es tan potente; pero induce buenos resultados en padecimientos del tipo de los linfomas No-Hodgkin, aunque con un grado de remisión menor (24). En los últimos años se ha mostrado que varios subtipos de IFN- α son eficaces en el tratamiento del linfoma de células T(42). En 1989 la FDA de los Estados Unidos (Food and Drug Administration) aprobó el empleo de esta citocina como el tratamiento de elección en desórdenes como las verrugas genitales y el sarcoma de Kaposi (58).

Existen otros padecimientos que presentan una respuesta favorable al tratamiento con IFN- α , entre ellos se encuentran: trastornos de linfocitos B, mieloma múltiple, papilomatosis laríngea, keratoconjuntivitis aguda por adenovirus, keratitis recurrente, hepatitis crónica B y C. Recientemente el IFN- β fue aprobado para su empleo en el tratamiento de la esclerosis múltiple (37,53).

El cuadro No. 2 resume algunos de los tratamientos en los cuales el empleo de los IFNs provoca efectos benéficos, así como los ensayos clínicos que siguen bajo estudio.

1.8 Toxicidad del IFN

La descripción de las propiedades antivirales y antiproliferativas mostradas por el IFN, sugirieron su potencialidad como un agente útil en la terapéutica de un gran número de enfermedades virales y neoplásicas, con pocos efectos sobre el resto de las células del organismo. Sin embargo, varios estudios mostraron que los interferones provocan efectos tóxicos en varias estructuras.

En el caso del sistema inmune el IFN- α acelera el desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes y en otros casos aumenta la actividad de las células inmunes responsables del rechazo de tejidos. Adicionalmente, algunos estudios muestran que el IFN- α conduce a una supresión de la actividad proliferativa de la médula ósea, lo cual provoca leucopenia y trombocitopenia (31).

Cuadro No. 2. Se muestran las indicaciones clínicas aprobadas para los diferentes interferones y aquellos padecimientos en los que están siendo actualmente ensayados.

	INTERFERON- α	INTERFERON- β	INTERFERON- γ
APROBADOS POR LA FDA	Hepatitis crónica B y C Leucemia de células falciformes Sarcoma de Kaposi Verrugas genitales causados por papilomavirus	Recidiva y remisión de esclerosis múltiple	Enfermedad granulomatosa crónica
ENSAYOS CLINICOS	Linfoma No- Hodgkin Melanoma maligno Cáncer de vejiga Tumor de colon Infección por HIV-1 Leucemia mielógena crónica Tumor de riñón	Carcinoma de células basales	Tumores de riñón Leishmaniasis

También el sistema nervioso es seriamente afectado por la acción del IFN. Varios reportes indican que los pacientes tratados con las diferentes clases de IFN, mostraron frecuentemente efectos indeseables tales como mialgias, dolor de pecho, entumecimiento, parestesias de manos y pies, fotofobia, astenia, adinamia, fatiga, letargo, dolor de cabeza, vértigo, náusea, mareo, vómito, anorexia, somnolencia, desorientación, pérdida de peso, calosfríos y fiebre (23,27,68). También algunos pacientes mostraron alteraciones conductuales y en los patrones de sueño (3). Adicionalmente los pacientes tratados con IFN- α en terapia anticancerígena, padecieron signos de desorientación espacio-temporal, lo cuales se acompañaron de alteraciones electroencefalográficas del tipo de un incremento en la actividad de ritmos lentos (70). Estos datos indican que el Interferón interactúa de manera alguna con las células del sistema nervioso, aunque no indican el mecanismo involucrado en esta acción.

CAPITULO II. ANTECEDENTES

2.1 Evidencias de la relación de los IFNs con el Sistema Nervioso Central

El cerebro está prácticamente aislado del sistema inmune debido a la carencia de vasos linfáticos y a la presencia de la barrera hematoencefálica, la cual impide la penetración de linfocitos y anticuerpos circulantes al cerebro. Sin embargo, resulta incongruente sugerir que ambos sistemas, de una importancia vital para la fisiología del organismo, trabajen independientemente uno de otro. Tal incongruencia dio inicio a líneas de investigación que intentaron definir tanto las posibles vías de comunicación como el mecanismo de acción involucrado. La modulación del sistema inmune por medio de sustancias neuromoduladoras recibió gran atención. Sin embargo, la modulación del sistema nervioso por sustancias con origen en el sistema inmune, como es el caso del IFN, no recibió tanta importancia como la sugerencia anterior. Actualmente existen datos muy significativos que apoyan la existencia de una comunicación recíproca entre estos dos sistemas, lo que conlleva a una modulación muy especializada entre ellos (Fig. 6).

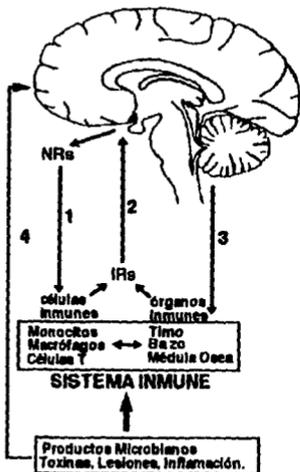


Fig. 6. La relación funcional que se establece entre el SNC y el SI se logra gracias a la acción de varios compuestos de origen neural e inmune. En este esquema, se muestran las diferentes vías de comunicación entre ambos sistemas. Así en 1 se refiere a la acción de los neuroreguladores (NRs) sobre las células inmunes, mientras que 2 describe el efecto de los inmunoreguladores (IRs) sobre el SNC. Con el número 3 se representa la acción mediada por nervios que el cerebro ejerce sobre los diferentes órganos del sistema inmune. Finalmente, los productos microbianos y sustancias tóxicas pueden inducir la síntesis y liberación de inmunoreguladores, ya sea por células del SI o por células del SNC (4).

Uno de los hallazgos que iniciaron al estudio de la interacción del interferón con el SNC, se relaciona con las alteraciones inmunológicas observadas en sujetos que se encuentran bajo condiciones de estrés (62). En estos individuos, la capacidad de respuesta inmunológica se disminuye y presentan una reducción tanto en la actividad de sus células NK, como del IFN- γ secretado por linfocitos T. En algunos casos se observa una reactivación de infecciones por herpes virus (16). La variedad de efectos inmunológicos que estos sujetos presentan, depende en gran parte de la naturaleza del agente estresante (16). Estos datos implican la existencia de una comunicación entre el cerebro y el sistema inmune (SI), el cual a su vez, ejerce una influencia sobre el cerebro (50).

Adicionalmente, los efectos colaterales indeseables observados durante la terapia anticancerígena con IFN- α tales como: mialgias, entumecimientos, parestesias de manos y pies, fatiga, náuseas, vómitos, confusión, anorexia, pérdida de peso, calostrios y fiebre (23,27,68), sugerían efectos provocados por una acción directa del IFN- α sobre el SNC. Las características de estos efectos sugirieron una acción de esta citocina sobre núcleos sensoriales, motores y del sistema límbico.

El primer reporte que mostró un efecto electrofisiológico del IFN- α sobre células nerviosas, lo publicaron Calvet y Gresser en 1979. Estos autores analizaron el efecto de esta sustancia sobre la actividad espontánea y provocada de las neuronas de la corteza cerebral y cerebelar de gatos recién nacidos. Además de incrementar la frecuencia de descarga de las neuronas, el IFN- α indujo descargas en ráfaga. Estos efectos se prolongaron durante horas. Cabe mencionar, que estas acciones sólo incluyeron a la frecuencia de descarga, sin modificación aparente de la morfología de las espigas registradas (28). En el caso de la actividad provocada, el IFN- α disminuyó la latencia y la intensidad del estímulo umbral; así como su duración. En este caso, tampoco modificó la amplitud de los potenciales eléctricos provocados.

Un año después, Blalock y Stanton, describieron que la adición de IFN- α a cultivos celulares de miocardio de ratón, provoca un aumento de su frecuencia de latido (10). En ese mismo año, Blalock y Smith intentaron mostrar que existía una relación estructural y biológica entre el IFN- α humano, y compuestos derivados de la proopiomelanocortina (precursor hormonal), tales como la corticotropina (hormona que estimula a la corteza suprarrenal), la melanotropina (estimula a los melanocitos de la piel), y las endorfinas (polipéptidos cerebrales con actividad opioide) (72). Esta relación surgió como consecuencia de sus hallazgos, los cuales mostraron que el suero anti- α -corticotropina, anti- α -melanotropina y anti- γ -endorfina, neutralizaron la actividad del IFN- α , pero no la actividad del IFN- β , el cual es estructuralmente diferente; mientras, que el suero anti-IFN- α , neutralizaba la actividad de la corticotropina. Contrariamente, antisueros de hormonas polipeptídicas que no muestran relación estructural con la corticotropina y las endorfinas; como el suero anti-hormona luteinizante y el anti-hormona folículo-estimulante, no neutralizaron la actividad del IFN- α (9). Blalock también mostró que los linfocitos que son estimulados con inductores de IFN- α son capaces de producir corticotropina y sustancias tipo endorfinas (71).

Este estudio mostró que el IFN- α comparte sitios antigénicos, o determinantes antigénicos comunes, con la corticotropina y las endorfinas, lo que sugeriría que el IFN- α podía ejercer sus efectos en el sistema nervioso por medio de la unión a receptores oploides, como lo hacen las

endorfinas.

En 1981, esos mismos autores, mostraron que la aplicación intracerebral de IFN- α humano en ratón, causó potentes efectos opioides similares a los endorfinicos, como son: analgesia, disminución de la locomoción espontánea y cataleonia. Todos estos efectos fueron bloqueados por la naloxona, un potente antagonista opioide (8). Ni el IFN- β o el IFN- γ ejercieron tales efectos, lo que indicó una clara diferencia de la actividad biológica entre estos IFNs, la cual está determinada por su estructura.

El análisis de la interacción del IFN- α con el sistema nervioso, implicaba la necesidad de realizar registros de la actividad electrofisiológica a nivel celular y comparar los efectos registrados en varios sitios del SNC. Inicialmente se realizaron estudios de actividad unitaria (registro de la actividad eléctrica de una sola célula), de neuronas de corteza cerebral y de tálamo medial, con administración microiontóforética (aplicación del fármaco en la inmediata vecindad de la célula que se registra) de IFN- α (61). Los resultados mostraron que el IFN- α provoca un aumento dosis-dependiente en la frecuencia de descarga eléctrica de las neuronas de la corteza cerebral de rata. Estos efectos se acompañaron de una disminución en la amplitud del potencial de acción, también de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, la mayoría de las células talámicas no respondieron a la aplicación de IFN. Todo ello sugiere que esta citocina ejerce su efecto selectivamente en ciertas neuronas. Las acciones sobre el potencial de acción indican un efecto inespecífico del IFN- α sobre algunos componentes de la membrana celular, de manera semejante a lo que ocurre cuando se aplican fármacos opioides (66). Tal observación fortalecía la idea de que el IFN- α ejercía sus efectos en el SNC a través de receptores opioides.

Más adelante, en 1983, ese mismo grupo de investigación trató de describir la posible interacción del IFN- α con neuronas del hipotálamo ventromedial (VMH) y neuronas del hipocampo dorsal (Hipp), así como determinar las características dosis-dependiente de la aplicación microiontóforética de diferentes dosis (corrientes) de IFN- α . Los resultados mostraron que el IFN- α (1×10^6 UI/ml) aplicado con 20, 50 y 100 nA, provocó un incremento de larga duración de la actividad de las neuronas hipocampales de manera dosis dependiente. Contrariamente, las neuronas del hipotálamo mostraron una respuesta mixta, es decir algunas respondieron con un aumento y otras lo hicieron con un decremento de su actividad espontánea. La dosis más alta de IFN- α provocó un cambio en la morfología de los potenciales de acción de ambas estructuras. Estos resultados son similares a los encontrados después de la aplicación microiontóforética de opioides en el hipocampo (32) y por la aplicación sistémica de opioides en VMH (14). Tales hallazgos nuevamente favorecieron la idea de que el IFN- α ejercía sus efectos por medio de la unión a receptores opioides.

En un estudio posterior, se reportó la capacidad del IFN- α humano para unirse a receptores opioides *in vitro*, en una preparación de cerebro de ratón (8). En este experimento el IFN- α desplazó a la 3H-dihidromorfina de su unión estereoespecífica con su receptor. Además, la citocina mostró una potente actividad tranquilizante y analgésica, similar a la provocada por endorfinas. Todos estos efectos fueron bloqueados por el pretratamiento con naloxona, sugiriéndose una vez más, una unión del IFN- α humano con receptores opioides.

Otros autores reportaron que la administración de IFN- α en ratas dependientes a la morfina, reduce y modifica el síndrome de abstinencia opioide desencadenado por la

administración intraperitoneal de una dosis de 1 mg/kg, de naloxona. Posterior a estos estudios surgió la necesidad de determinar tanto electrofisiológica como farmacológicamente la interacción del IFN- α con los receptores opioides. Un primer experimento, utilizó la preparación de sistema nervioso entérico de ileo de cobayo, clásica en el estudio y descripción farmacológica de los mecanismos opioides (26). El empleo de este modelo ha permitido la caracterización de varios receptores opioides y el estudio de las interacciones con sus agonistas. La aplicación del IFN- α en el ileo de cobayo indujo un incremento en la excitabilidad que se tradujo en un aumento de las contracciones eléctricamente inducidas, lo cual fue resistente a la adición de naloxona. Esta acción es contraria a la observada después de la aplicación de opioides. Posteriormente se realizaron registros extracelulares con la aplicación microiontóforética en células de corteza cerebral de rata. Se realizó la aplicación aislada y simultánea de IFN- α , morfina y naloxona, sobre estas neuronas (64). La citocina indujo un aumento en la actividad espontánea de las neuronas de la corteza; mientras que la morfina indujo el efecto opuesto, es decir, un decremento en su actividad espontánea, el cual se revertía con la aplicación de naloxona. Tal reversión no se realizó sobre los efectos provocados por el IFN- α . Finalmente, la aplicación simultánea de IFN- α y morfina, produjo acciones idénticas a las observadas después de aplicar únicamente el IFN- α , bloqueándose el patrón de respuesta de la morfina. Los resultados indican, que aunque el IFN- α induce efectos similares a la morfina, estos no son consecuencia de una asociación con receptores opioides (64).

Estudios realizados empleando una técnica electroencefalográfica, mostraron que la aplicación intraperitoneal de IFN- α induce efectos en la mayoría de las estructuras nerviosas. Una sola administración de esta citocina, en una dosis de 1500 U/vg, que es la dosis empleada en clínica provocó un incremento muy importante en el voltaje y la frecuencia de todo el electroencefalograma, predominantemente sobre el hipocampo y la corteza sensorial; hasta 72 hr después de su aplicación sistémica (13).

Con técnicas electrofisiológicas, algunos autores analizaron los efectos de 4 diferentes preparaciones de IFN- α y 4 fracciones de IFN- γ sobre neuronas de la corteza cerebral e hipocampo dorsal en la rata (60). La aplicación microiontóforética de todos los IFNs- α indujo un incremento en la descarga eléctrica de las neuronas tratadas, con ligeras diferencias en la intensidad de la respuesta y en el número de neuronas afectadas. Tales diferencias pueden ser explicadas por factores farmacocinéticos de las preparaciones, más que por factores farmacodinámicos. Estos efectos fueron dosis-dependientes y se presentaron tanto en las neuronas hipocámpales como en las corticales. Ninguna de las fracciones de IFN- γ provocó efecto alguno sobre estas estructuras. Estos resultados confirmaron los efectos electrofisiológicos del IFN- α como consecuencia de la acción de esta citocina sobre la membrana celular de estas neuronas.

En un reporte posterior los mismos autores mostraron, con estudios conductuales y electrofisiológicos, que el IFN- α muestra una alta especificidad y/o selectividad tanto del sitio de acción, como del mecanismo implicado para inducir los efectos antes descritos (15). Además los estudios conductuales, que relacionaron al IFN- α con el síndrome de abstinencia a la morfina, indicaron que la adicción opioide está relacionada, al menos en parte, con el sistema inmune y que un agente inmunomodulador, como lo es el IFN- α , afecta selectivamente la actividad de neuronas del sistema nervioso (15).

En 1987, Nakashima y colaboradores estudiaron el efecto del IFN- α recombinante humano sobre la actividad de las neuronas del hipotálamo anterior, la región preóptica (PO/AH) y el hipotálamo ventromedial (VMH) en rebanadas de cerebro. El propósito consistía en determinar si la fiebre y la pérdida del apetito, observadas en pacientes tratados con IFN- α , resultaban de la acción de esta citocina sobre las neuronas hipotalámicas implicadas en la termorregulación y la ingesta de alimento (51). El 76% de las neuronas del PO/AH mostraron cambios en su frecuencia de descarga con dosis de 10 a 1800 unidades/ml (respuesta excitadora) y de 100 a 4400 unidades/ml (respuesta inhibitoria). En el caso VMH, el IFN- α provocó un incremento en la frecuencia de descarga. La aplicación simultánea de naloxona bloqueó el efecto inhibitorio del IFN- α sobre las neuronas de PO/AH y el excitador en las neuronas del VMH. Los autores analizaron también el significado funcional de las neuronas afectadas por la acción del IFN- α ; así, las células del PO/AH que mostraron un efecto por la citocina, resultaron termosensitivas; es decir, mostraron cambios en su actividad eléctrica al modificar la temperatura (34 a 41°C) del medio. En estas células el IFN- α disminuyó la actividad de las neuronas sensibles al calor e incrementó aquella de las neuronas sensibles al frío, lo cual induce una ganancia de calor y como consecuencia, la fiebre. De manera similar, las neuronas del VMH excitadas por el IFN- α , modificaban su actividad al incrementar la concentración de glucosa en la solución.

Existen otras citocinas, tales como la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), que en conjunto con el IFN- α , han sido caracterizadas como pirógenos endógenos. Su aplicación en forma sistémica o intracerebroventricular a conejos, gatos y ratones, induce fiebre (2), probablemente por su acción a nivel hipotalámico (51), a través de un mecanismo independiente de la concentración extracelular de Ca^{2+} (52). Las acciones antipiréticas de las citocinas son bloqueadas por la naloxona, pero no por un antagonista antipirético del tipo de los salicilatos de sodio. En este mecanismo es probable que también estén involucradas otras tipos de sustancias como la prostaglandina E_2 (19), cuya producción y liberación se incrementa en presencia de IFN- α . Esta prostaglandina bloquea la respuesta a endotoxinas y pirógenos leucocitarios. Por otro lado, estudios recientes sugieren que el sitio de acción de las citocinas inductoras de fiebre y provenientes del plasma sanguíneo, puede ser, además del hipotálamo, el *organum vasculosum lamina terminalis*. Este es un órgano circumventricular que carece de barrera hematoencefálica y que está involucrado en el proceso de transducción de las señales químicas en eléctricas para la producción de la fiebre. Por ejemplo, Shibata y cols. examinaron la respuesta extracelular de las neuronas de esta estructura a la aplicación de las citocinas pirógenas, el TNF- α y el IFN- α en rebanadas de cerebro de cobayo (69). El 43% de las neuronas aumentaron su frecuencia de descarga, mientras que el 57% restante no presentó cambio alguno en su actividad.

También otras citocinas inducen acciones neurotóxicas similares a las provocadas por el IFN- α . Por ejemplo, Fent mostró que la Interleucina 2 (IL-2) produce efectos neurotóxicos, como fatiga, debilidad, letargo y confusión (23). Posteriormente De Sarro y colaboradores estudiaron los efectos conductuales y el electrocorticograma (ECoG) o actividad eléctrica cortical, provocados por la aplicación de IFN- α , IFN- β e IL-2 (18). El IFN- α en dosis de 1000 a 10000 UI/kg, produjo "sacudidas de perro mojado" en la rata, seguido de un período de somnolencia, pérdida de la actividad locomotriz, con un aumento en la actividad de onda lenta y en ocasiones con ondas de alto voltaje en el ECoG. Por su parte, la administración del IFN- β careció de alguno de estos efectos. Cuando el IFN- α se aplicó por vía i.c.v. se observó un aumento

en la sincronización en el ECoG, así como un período de sedación y/o sueño en las ratas. Estos mismos efectos se indujeron con dosis mucho menores, cuando el IFN- α o la IL-2 se aplicaban directamente sobre el locus coeruleus. Mientras que su aplicación en el núcleo caudado, hipocampo dorsal, sustancia nigra y VMH, no produjo efectos conductuales o ECoG significativos.

Es probable que la hipnosis observada durante las infecciones, sea también una consecuencia del efecto central de las citocinas. El IFN- α aplicado en ratas incrementa la fase No MOR (sin Movimientos Oculares Rápidos) sin modificar el sueño MOR (18), este efecto como consecuencia de una acción a nivel del locus coeruleus.

Esta estructura del tallo cerebral, interviene en la regulación del sueño conductual y electroencefalográfico; además, sus neuronas contienen α -adrenorreceptores y receptores opioides. Es probable entonces que estas citocinas podrían actuar a través de receptores opioides o también incrementando la conductancia de la membrana al ión potasio, como lo hacen los agonistas α -adrenérgicos.

En 1991, Katafuchi y col. mostraron que en ratas, tanto la inyección i.c.v. (1×10^4 UI), como la i.v. (3×10^4 UI) de IFN- α provocó un incremento a largo plazo, al menos de 60 minutos, en la actividad eléctrica de los filamentos nerviosos simpáticos del bazo (39). Estos datos indican, que el IFN- α alcanza varios sitios cerebrales, probablemente por su transporte a través de los órganos circumventriculares. Estas estructuras carecen de barrera hematoencefálica y se encuentran cercanos al área ventricular.

En lo relacionado a la anorexia (pérdida del apetito) observada en los pacientes tratados con IFN, ésta puede ser resultado de una acción en el hipotálamo ventromedial VMH y/o el hipotálamo lateral (HL). El hipotálamo forma la porción ventral del diencefalo, éste se relaciona con el telencéfalo basal rostralmente y con el mesencéfalo por su parte caudal. Rodea al tercer ventrículo y se encuentra por arriba de la glándula pituitaria a la cual se une por medio del tallo hipotalámico. El hipotálamo está conformado por dos grandes subdivisiones: medial y lateral, este último contiene un núcleo muy extenso pero mal delimitado, denominado núcleo lateral hipotalámico (47) (Fig. 7).

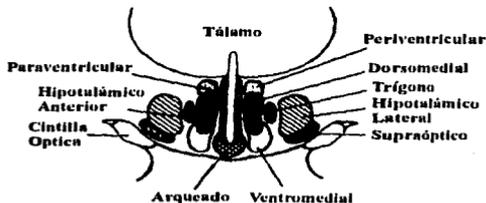


Fig. 7. Representación esquemática que muestra la relación anatómica que guardan los diferentes núcleos hipotalámicos. Se muestra la localización y extensión del hipotálamo lateral, sitio registrado en este trabajo.

Desde el punto de vista funcional, el hipotálamo interviene en la regulación de la secreción de la hipófisis anterior, en el balance de agua, en la regulación autonómica (control de los mecanismo simpáticos y parasimpáticos), de la ingesta de alimento y la sed, en la reproducción, la mediación de los mecanismos de reforzamiento y la generación y modulación de los ritmos circadianos (47). En el HL se controla la sed por medio de microcircuitos regulados por osmo-receptores, y el apetito por circuitos conformados por neuronas sensibles a la glucosa. El hambre y la sed, junto con otras funciones, están controladas y distribuidas por todo el HL, el cual se encuentra adyacente al hipotálamo ventromedial (HVM) (Fig 8).

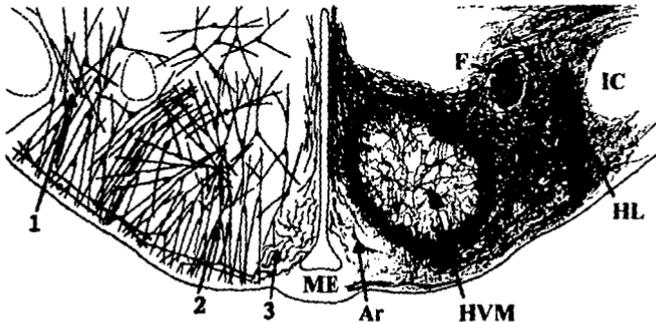


Fig. 8. Sección transversal a través de hipotálamo de ratona, en donde se ilustra el arreglo de las dendritas y axones. 1) Las dendritas del HL se extienden en direcciones mediolateral y dorsoventral. 2) Las dendritas largas del HVM se extienden en todas direcciones desde el núcleo. 3) Las pequeñas neuronas bipolares del arquado (Ar) se sitúan adyacentes al tercer ventrículo, junto a la eminencia media (ME).

Los núcleos hipotálamicos ventromediales y laterales contienen neuronas sensibles a parámetros metabólicos endógenos, tales como los niveles de glucosa, insulina y ácidos grasos que participan en el control de la ingesta de alimento y el balance energético. Por esta razón, la estimulación de la región lateral del hipotálamo provoca un incremento en la ingesta de alimento, fenómeno conocido como **hiperfagia**.

Por otro lado, la estimulación de los centros ventromediales resulta en la saciedad completa del animal, el cual se rehusa a comer; a este fenómeno se le denomina **hipofagia**. Por el contrario, si se lesiona cualquiera de estas áreas, se presentan los efectos opuestos a la estimulación de las mismas. Debido a ello, el HL es considerado como el centro del hambre, mientras que HVM constituyen el centro de la saciedad (30). Cabe señalar que no sólo el hipotálamo influye sobre la ingesta de alimentos, también otros centros nerviosos participan en

esta función.

Hori y Nakashima describieron que las neuronas del HVM que responden a los niveles de glucosa son sensibles al IFN- α (33). Recientemente, se observó que el sitio probable de los efectos anoréxicos del IFN- α es el hipotálamo lateral (63).

Autores como Plata-Salamán y col. analizaron también el papel del IFN- α en la regulación central de la ingesta de alimentos. Sus resultados mostraron que la microinfusión i.c.v. de IFN- α produjo una reducción tanto en la ingesta, como en la cantidad de la comida y en su duración; mientras que la frecuencia de ésta se vió ligeramente incrementada (57).

Además del control de las funciones vegetativas y endócrinas, el hipotálamo ejerce efectos sobre el comportamiento emocional de animales y seres humanos. Por ejemplo, la estimulación del HL no sólo provoca sed y hambre, también se aumenta el nivel general de actividad del animal, conduciendo a veces a reacciones de cólera y furia. Por el contrario, la lesión de esta zona provoca una pasividad extrema, acompañada de la pérdida de la mayoría de sus impulsos (30).

El mecanismo de acción por el cual el IFN- α interactúa con las neuronas para inducir todos estos efectos, es aún desconocido. Sin embargo, podemos afirmar que esta interacción implica una acción sobre la excitabilidad neuronal de las células del hipotálamo. Los efectos genómicos (relacionados con los genes) de esta citocina, involucran mecanismos de largo plazo que tardan horas y días en manifestarse; mientras que los efectos sobre la excitabilidad celular, se presentan en cuestiones de segundos, minutos cuando mucho. Tal discrepancia temporal implica la existencia de dos mecanismos diferentes.

La excitabilidad neuronal se refiere a la capacidad que tienen estas células para responder a los estímulos y transmitir esta respuesta. Este fenómeno de la materia viva, en las neuronas, esta determinado por el nivel de polaridad eléctrica, es decir, por la diferencia de cargas entre el interior y el exterior, que existe a través de la membrana celular. Este nivel de polaridad es definido como el potencial de membrana celular. En condiciones fisiológicas y de reposo, este nivel se aproxima a un valor de -90 mV, con negatividad en el interior y positividad en el exterior de la membrana celular. Cualquier procedimiento que incremente o decremente esta diferencia de potencial, modificará el nivel de excitabilidad celular. Entonces, aquellas sustancias que reduzcan la diferencia de cargas; es decir, que despolaricen a la membrana, provocarán un incremento en la excitabilidad, lo contrario ocurrirá con aquellas que incrementan, hiperpolarizan, tal diferencia de cargas. Los fenómenos de despolarización e hiperpolarización, son consecuencia del paso de iones a través de sitios específicos de la membrana celular. Estos sitios descritos como canales iónicos, muestran una cinética muy característica y peculiar para cada uno de ellos y en general, son comandados por señales y sustancias en forma muy específica (35).

Desde el punto de vista eléctrico el IFN- α es capaz de inducir un incremento o un decremento de la frecuencia de descarga de las neuronas hipotalámicas, lo que a un nivel celular se asociaría a un cambio en el grado de excitabilidad y como consecuencia en el nivel del potencial de membrana de la célula. Sin embargo, los mecanismos a nivel de la membrana responsables de tales efectos del IFN- α son aún desconocidos. Es probable que en ellos se

encuentren involucrados procesos de cierre y apertura de canales iónicos, lo cual determinaría que algún ión penetre o deje de penetrar al interior de la célula. Tal cambio en la permeabilidad iónica, provocará modificaciones en el nivel del potencial de membrana y por ende en el nivel de excitabilidad celular. Por lo tanto el mecanismo utilizado por esta citocina, necesariamente tendrá que relacionarse con un proceso a nivel de membrana que involucre una modificación en algún tipo de canal, el cual a su vez, provocará efectos de corta latencia y larga duración sobre el nivel de excitabilidad celular. Un candidato ideal en este proceso son los canales de calcio, debido a que la modificación en su cinética molecular, puede provocar efectos muy similares a los observados con la administración de esta citocina.

Los canales de calcio son proteínas de alto peso molecular que se incrustan dentro de la capa típica de todas las membranas celulares formando un poro acuoso (73). En términos generales, éstos se agrupan en dos tipos; los canales HVA (Canales que se activan con voltajes altos) y los LVA (Canales que se activan con voltajes bajos). La apertura de estos canales, la cual depende del grado de polaridad de la membrana celular, provoca un incremento en la concentración intracelular del calcio libre, lo que desencadena toda una cascada de eventos bioquímicos que culminan con la modificación de la función celular (Fig. 9).

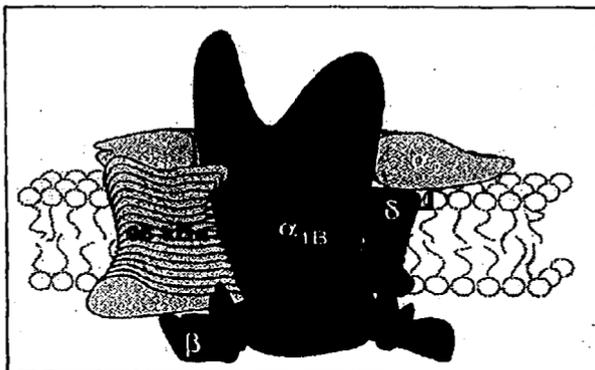


Fig. 9. Los canales de calcio de tipo HVA están conformados por diferentes componentes los cuales varían dependiendo del tejido que se trate. Esta representación de un canal neural, muestra los componentes $\alpha_{1\beta}$, α_2 , β , δ , y la proteína sensora de voltaje que en este caso es una proteína con un peso molecular de 95 kDa. El canal por donde atraviesa el ión calcio está conformado por la proteína $\alpha_{1\beta}$.

Varios estudios han descrito que la concentración intracelular de calcio libre constituye el mecanismo más importante que modula la expresión funcional, el desarrollo y la

diferenciación celular. Muchos de los factores hormonales y de crecimiento que modifican alguno de los parámetros que definen el crecimiento y diferenciación celular, actúan a través de modular la entrada de estos iones; particularmente lo realizan manteniendo un control dirigido hacia los canales de bajo voltaje de calcio (21). Bajo estas consideraciones resulta congruente sugerir que el sitio blanco para las acciones del IFN- α lo constituye la serie de los canales de calcio de las células hipotálamicas laterales.

Estas neuronas hipotálamicas laterales están entremezcladas con fibras longitudinales del haz prosencefálico medial, el cual se origina en diversos sitios extra e intrahipotálamicos. Sus axones se orientan perpendicularmente a las fibras del haz, realizando contactos sinápticos con algunas de éstas. Estas células se agrupan en una forma muy difusa, por lo que no forman núcleos compactos ni estructuras estratificadas como ocurre en otras regiones cerebrales. En la Fig. 10, se muestra la posición de tales neuronas.

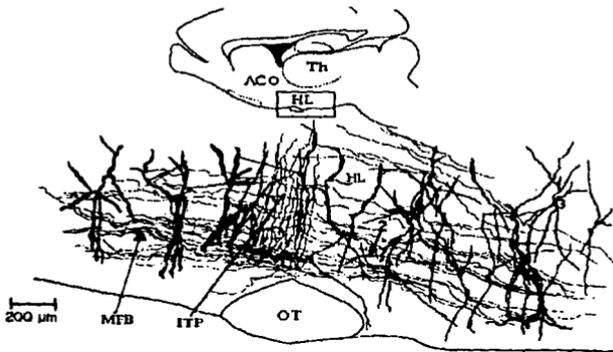


Fig. 10. Corte sagital del HL. El área dentro del cuadro indica la región hipotálamica que está ampliada. 1) La mayoría de las neuronas del HL se encuentran perpendiculares al haz prosencefálico MFB. 2) Algunas de las neuronas localizadas en la parte ventral, se encuentran paralelas al haz. 3) La complejidad de la ramificación dendrítica varía de una neurona a otra. Algunas de ellas son esencialmente planares o de dos dimensiones y otras son esféricas o de tres dimensiones.

El soma neuronal de estas células es fusiforme, triangular o esférico y se va adelgazando hasta terminar en dos o tres dendritas. Sus diámetros varían entre menos de 10 hasta 50 μm o más. Las neuronas del hipotálamo lateral (HL) y el hipotálamo ventromedial (HVM) tienen dendritas relativamente rectas, sin ramificaciones hacia el tallo cerebral. Estas pueden medir desde 100 hasta 600 μm (45) (Fig. 11).

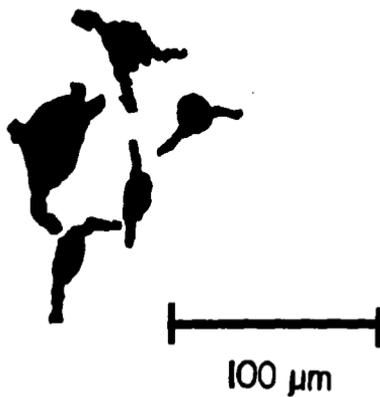


Fig. 11 Cinco somas neuronales de HL localizados en la misma sección horizontal de una rata de 25 días de edad. Nótese la diferencia en tamaño y forma.

CAPITULO III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

El IFN- α provoca efectos electrofisiológicos en varios grupos celulares cerebrales, incluyendo al HL. Estos efectos resultan de una interacción con la membrana celular y traen como consecuencia un cambio en el nivel de excitabilidad y en la frecuencia de descarga de las mismas neuronas. La acción sobre el HL se traduce conductualmente como una pérdida del apetito. El mecanismo celular implicado en este efecto es aún desconocido. Varias observaciones sugieren una acción mediada a través de canales de calcio, situación que intentaremos analizar en el presente trabajo.

OBJETIVOS:

1. Caracterizar el efecto del IFN- α humano sobre la actividad eléctrica de las neuronas del hipotálamo lateral en rebanadas de cerebro de rata.
2. Describir la relación entre el efecto inducido por el IFN- α y la respuesta fisiológica de la membrana celular hacia dos neurotransmisores existentes en este sitio, el glutamato (GLU) y el ácido gama-amino-butírico (GABA).
3. Determinar el efecto del IFN- α sobre la dinámica e intensidad de las corrientes de calcio en registros de fijación de voltaje en porciones de membrana (Patch-Clamp).

HIPOTESIS:

Si los efectos sobre la excitabilidad celular, ejercidos por el IFN- α , están mediados por su interacción con los canales de calcio, entonces la aplicación de esta citocina provocará un cambio en las corrientes de este ión. Esta acción inducirá cambios en la respuesta de estas células hacia algunos de sus neurotransmisores.

CAPITULO IV MATERIALES Y METODOLOGIA

1 Material Biológico.

Para la realización de los experimentos se utilizaron 60 ratas machos adultos de la cepa Wistar, con peso entre 180 y 220 g, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, CU. Estos animales se mantuvieron en cajas de acrílico individuales, con acceso libre al agua y alimento (Purina Rat Chow) durante al menos 15 días antes de la fase experimental. Durante su habituación en el laboratorio, los sujetos se expusieron a ciclos de luz-oscuridad de 14-10 hrs., y temperatura controlada a 25 ± 2 °C.

2 Material quirúrgico.

- Pinzas de disección
- Pinzas gubias (para cortar hueso)
- Tijeras rectas largas
- Espátulas de acero inoxidable
- Bisturí

3 Material básico

- Vasos de pp de 100, 250 y 500 ml
- Cajas de Petri de 10 cm de diámetro
- Pipetas graduadas de 1 y 5 ml
- Frascos Mariotte de 3000 ml
- Microjeringas Hamilton de 50 μ l
- Micropipetas Eppendorf de 100 μ l
- Termómetro Taylor de 100°C
- ~~Cajas~~
- Capilares GC120F-10 Clark Electromedical Instruments.

4 Reactivos

- Cloruro de sodio NaCl (J.T. Baker)
- Cloruro de potasio KCl (J.T. Baker)
- Fosfato diácido de sodio monohidratado $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Sulfato de magnesio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Cloruro de calcio CaCl_2 (Merck)
- Carbonato de sodio NaHCO_3 (J.T. Baker)
- Dextrosa anhidra $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Productos Químicos Monterrey)
- Colorante Fast Green FCF (Sigma Chemical Company)
- Acido L-Glutámico (GLU) (Sigma Chemical Company)
- Acido Gama-amino-butírico (GABA) (Sigma Chemical Company)
- IFN- α humano recombinante, liofilizado (Immuno Modulators Laboratories, Inc. Corporate Stafford, Tx 77477).
- Cloruro de Cesio CsCl (Sigma Chemical Company)

- HEPES (Calbiochem Company)
- Glucosa (Sigma Chemical Company)
- Gluconato de Cesio (Sigma Chemical Company)
- Tetrodotoxina TTX (Sigma Chemical Company)
- Ácido etil-glicol-aminoetil-tetra-acético EGTA (Sigma Chemical Company)
- MgATP (Sigma Chemical Company)
- GTP (Sigma Chemical Company)
- Albúmina (Sigma Chemical Company)

5 Soluciones.

SOLUCION RINGER-KREBS-HENSELEIT.

La composición de la solución Ringer en mM, fue la siguiente: 124 de NaCl, 5.5 de KCl, 1.24 de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 26.0 de NaHCO_3 y 10.0 de dextrosa. El pH de la solución osciló entre 7.38 y 7.52 y la osmolaridad de 290 a 310 mOsm. La solución se oxigenó con una mezcla de 95% O_2 + 5% de CO_2 .

El Ringer utilizado en el registro de fijación de voltaje en porciones de membrana, con una configuración de célula entera para corrientes de calcio, tenía la siguiente concentración en mM: NaCl 150, CsCl 3.0, CaCl_2 2.5, Glucosa 10.0, HEPES (compuesto amortiguador) 5.0. La solución contenía además 1 μm de un agente bloqueador de canales de sodio, en este caso se utilizó la tetradotoxina (TTX). El pH osciló entre 7.3 y 7.4, y en caso necesario se ajustó con NaOH 1N. La osmolaridad fue de 300 a 315 mOsm, y ésta se ajustó al agregar más o menos HEPES.

Solución de llenado para el electrodo de registro de fijación de voltaje en porciones de membrana en mM: Gluconato de Cs 130.0, NaCl 10.0, EGTA 10 mM, HEPES 5.0, MgATP 4.5, GTP 0.1, pH de 7.3 a 7.4 y osmolaridad de 310-325 mOsm.

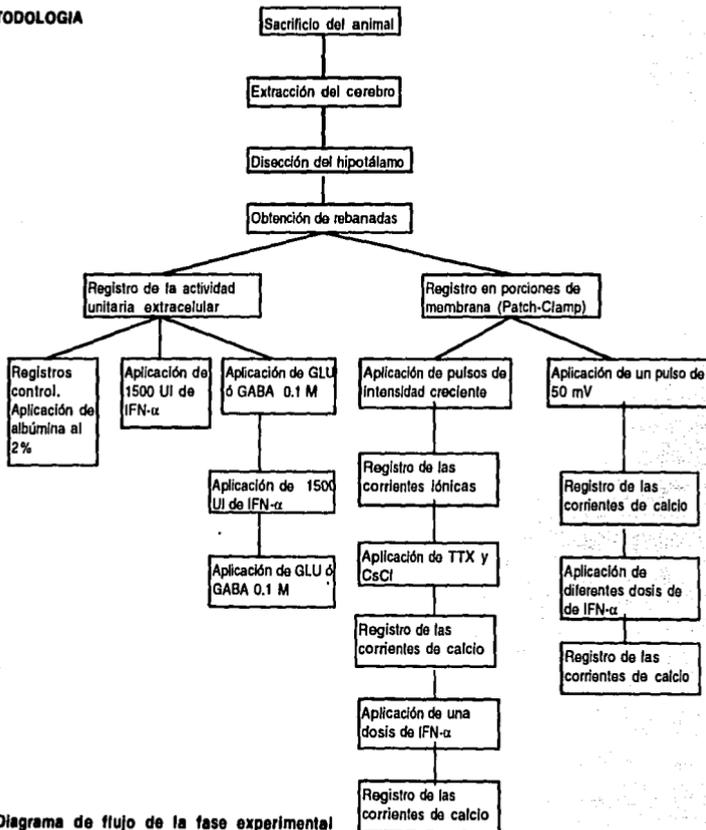
El IFN- α se disolvió en una solución de albúmina al 2 % en agua bidestilada, para lograr una concentración final de 1 500 UI, en 45 μl . Tanto el GLU como el GABA fueron disueltos en solución salina al 0.9% y aplicados en concentraciones que oscilaron entre 0.01 y 1.0 M.

6 Equipo

- Teletermómetro de 40°C Modelo 43TA. (Yellow Springs Instrument Co., Inc.)
- Estirador de pipetas vertical Modelo 700 C. (David Kopf Instruments Tujunga, California)
- Osmómetro (Precision System Inc. Sudbury, Mass.)
- Vibrotomo de 110 V (Campden Instruments LTD.)
- Microscopio invertido Modelo IMT2 (OLYMPUS OPTICAL CO. LTD)
- Micromanipulador Modelo MX300R (Newport)
- Recirculador con termostato (B & T Circon, England)
- Preamplificador Grass Modelo P511K (Grass Instruments Co.)
- Audio monitor Modelo AM8B (Grass Instruments Co.)

- Osciloscopio de 2 canales Modelo 2225 (Tektronix)
- Computadora
- Amplificador Axopatch 2A (Axon Instruments).
- Convertidor análogo-digital Digidata 2A (Axon Instruments).
- Micromanipulador neumático (Stoelting).
- Microforja térmica (Narishige)
- Estirador vertical de 2 etapas (Narishige)

METODOLOGIA



7 Preparación del corte de tejido

El animal fue sacrificado por dislocación cervical. Inmediatamente después con un bisturí se hizo un corte en el cuero cabelludo, a lo largo de la línea media de la cabeza, para dejar al descubierto el cráneo. Con las tijeras se realizó un corte a nivel de la columna vertebral cervical y con ayuda de las pinzas gubias se rompió y se retiró el hueso del cráneo para descubrir el cerebro. Este fue extraído cuidadosamente de su lugar con la ayuda de una espátula.

Posteriormente, el cerebro se trasladó a una caja de Petri, la cual contenía una gasa húmeda con solución Ringer-Krebs-Henseleit a 4°C. Se colocó el cerebro en posición dorsal y se hizo un corte en la parte posterior, anterior, dorsal y laterales de éste, con el propósito de eliminar lo más posible las estructuras que rodean al hipotálamo. Se obtuvo entonces un pequeño bloque cerebral que contenía al hipotálamo. Este tejido se transfirió a la base de la cámara de un vibrotomo que contenía solución Ringer-Krebs-Henseleit a 4°C oxigenada con 95% O₂ y 5% CO₂. Todo este procedimiento se realizó en menos de 3 minutos para reducir al máximo la muerte neuronal por hipoxia.

El bloque de tejido se fijó sobre la base de la cámara del vibrotomo con un pegamento de cianoacrilato. Después, se procedió a realizar cortes coronales con un grosor de 400 µm para escoger aquellas rebanadas de tejido donde se localizara el HL. Con la ayuda de una espátula de madera, la rebanada seleccionada se transfirió a la cámara de registro, colocándose sobre un aro con malla de nylon, el cual sirvió como soporte al tejido; además, de permitir la circulación de la solución Ringer por encima y por debajo de la rebanada. La cámara de registro se conectó a un sistema de perfusión, que le permitía tener un flujo constante de 1.5-2 ml/min, de solución. Gracias a una bomba de recirculación térmica, la solución se calentaba hasta alcanzar una temperatura de 35 a 37 °C, evitando con ello el perfundir una solución fría y provocar un choque térmico en las neuronas. El volumen de la solución siempre se mantuvo constante dentro de la cámara. La temperatura se determinó en cada momento, por medio de un termómetro. Se equilibró la rebanada con su solución durante una hora en tales condiciones, con el propósito de darle tiempo para estabilizarse y recuperarse del trauma del procedimiento.

8 Preparación de micropipetas.

Pipetas para el registro extracelular

Las micropipetas se prepararon durante el tiempo de recuperación del tejido. Se colocaron los capilares en el estirador de pipetas vertical con una temperatura y peso del solenoide suficientes para obtener pipetas con una punta de aproximadamente de 1.0 a 2.0 µm. Posteriormente éstas se llenaron con una solución 4 M de NaCl con colorante verde rápido en una concentración saturada. Esta solución sirve como puente entre el tejido y el electrodo. Ya lista la pipeta, se le introdujo un alambre de plata y se colocó en el micromanipulador para dar inicio al registro.

Pipetas para el registro de la fijación de voltaje en porciones de membrana celular.

Estas pipetas se prepararon en el estirador vertical de dos etapas, el cual inicialmente proporciona una temperatura y una fuerza suficiente para producir un adelgazamiento del 90% del grosor de la pipeta, sin fracturarla. Posteriormente el estirador genera sólo una fuerza, sin calor, la cual fractura en forma horizontal a la porción más delgada de la pipeta. Estos electrodos se pulieron para eliminar cualquier rugosidad o irregularidad capaz de romper la membrana celular. El pulido se realiza bajo inspección visual en una microforja con una bobina caliente de tungsteno. La punta de la micropipeta finalmente alcanza un diámetro de aproximadamente 4 a 8 μm (Fig 12).

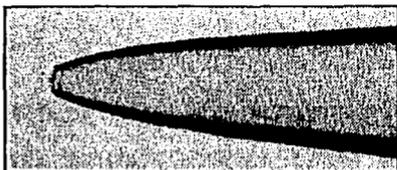


Fig. 12.

Estas micropipetas se llenaron con la solución interna antes mencionada. Únicamente se utilizó una micropipeta de este tipo por cada intento de registro. Una vez que una micropipeta estuvo en contacto con cualquier elemento diferente a la solución, su capacidad para asociarse a la membrana celular se pierde, por lo que es necesario desecharla y utilizar una nueva. Una sesión de registro puede utilizar tantas como 100 micropipetas de éstas.

9 Registro de la actividad unitaria extracelular de las neuronas

La cámara de registro se colocó sobre la platina del microscopio invertido, gracias al cual se localizó visualmente el área donde se realizaría el registro. Después, con los tornillos milimétricos del micromanipulador se colocó la micropipeta sobre la superficie del tejido. Posteriormente, con los tornillos micrométricos, se penetraba la rebanada y se desplazaba la micropipeta en las tres direcciones, hasta alcanzar un sitio donde se observaba una buena actividad neuronal. En estas condiciones se registró la actividad eléctrica de sólo una neurona durante un periodo de 15 minutos (actividad basal). Al final de los cuales y utilizando una microjeringa, se aplicó una dosis de 1,500 UI de IFN- α recombinante humano disueltas en un volumen de 45 μl . Este IFN- α se mantuvo en la solución del baño durante 5 min, para posteriormente perfundir nuevamente al tejido. El registro de la actividad unitaria se continuó durante los 40 minutos siguientes a la aplicación, para obtener un total de 60 min de registro. En otros experimentos se adicionó un volumen de 45 μl conteniendo ya sea GLU o GABA en concentraciones de 0,01 a 1M durante 5 min. Estas aplicaciones se realizaron tanto antes de suministrar el IFN- α como 30 minutos después de su aplicación. Los efectos observados por la aplicación de IFN- α fueron comparados con aquellos obtenidos después de adicionar una solución de albúmina al 2%. En estas condiciones tales registros fueron considerados como controles.

Los potenciales eléctricos de las neuronas fueron capturados inicialmente por el microelectrodo para ser enviados, a través de una sonda de alta impedancia, hacia un preamplificador, cuya salida alimentaba un audiomonitor, un osciloscopio y un convertidor analógico-digital. Este último formaba parte de un sistema de análisis de tal actividad y cuyo elemento principal, lo compone una computadora Altor/Plus.

10. Registros de fijación de voltaje en porciones de membrana.

Estos registros se realizaron en rebanas de hipotálamo lateral, obtenidas y preparadas de la misma manera que en el registro previamente descrito. Una vez que la rebanada se encontraba en la cámara de registro, Utilizando una microbomba neumática se aplicaron "chorros" de solución a través de una micropipeta dirigida sobre el soma de la neurona, para despejar la superficie externa de la membrana celular (Fig. 13).

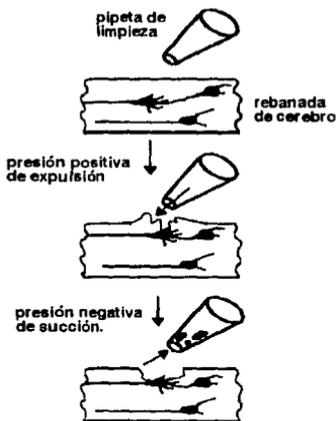


FIG. 13. El procedimiento básico para realizar registros de patch-clamp en rebanadas de hipotálamo, implica inicialmente el limpiar la superficie de la neurona utilizando la expulsión de solución externa a presión positiva, y la absorción de los detritos con una presión negativa, tal como se muestra en el presente diagrama.

Entonces se acercó a esta superficie una micropipeta pulida para realizar un sello de alta resistencia.. Durante esta aproximación se inyectó un pulso de voltaje de aproximadamente 20 volts, 20 mseg y 5 Khz, a través de la pipeta. Tal pulso fue detectado en forma constante en la pantalla del osciloscopio. Cuando la micropipeta tocó a la superficie celular el tamaño del pulso se redujo, indicando un incremento de la resistencia. Finalmente al formarse el sello, el pulso desapareció completamente, debido a la gran resistencia en la punta de la pipeta.

La formación del sello de alta resistencia indicó el momento necesario para fracturar un pedazo de membrana y poner en contacto el líquido intracelular con la solución interna de la micropipeta (Fig.14).



FIG. 14. El inicio del registro de corrientes en porciones de membrana aislada (Patch-Clamp), requiere de la formación de un sello celular de alta resistencia; para ello, es necesario acercar una pipeta recién elaborada a una porción limpia de la membrana celular. Posteriormente, cuando el sello muestra propiedades de una resistencia muy alta, utilizando un vibrador de alta frecuencia, se rompe la porción interna de esta membrana celular.

Una vez formado el sello de alta resistencia, se inició el primer tipo de registro de Patch-Clamp, fijando el potencial de membrana de la célula en -80mV y se aplicaron pulsos de varias intensidades, para activar las corrientes de los diferentes iones que condicionan la excitabilidad celular. Estos registros sirvieron para caracterizar las diferentes corrientes iónicas. Posteriormente, con la aplicación de soluciones con diferentes composiciones iónicas, se eliminaron aquellas corrientes no requeridas para el objetivo del experimento. Por ejemplo, con el empleo de Tetrodotoxina, agente bloqueador específico de los canales de sodio dependientes de voltaje, se obtienen corrientes en las que no participa este ión.

Inicialmente se determinaron las corrientes de calcio por medio de la aplicación de pulsos de intensidad creciente en 10 mV , con duración de 200 mseg , y una frecuencia de 5 Hz . Estos pulsos se iniciaron en 10 hasta 120 mV . En estos experimentos se utilizó Tetrodotoxina y CsCl para eliminar las corrientes de sodio y potasio, respectivamente. Cada uno de estos pulsos de asoció a un tipo especial de corrientes de calcio. Posteriormente, esta estimulación se repitió, tanto en presencia de una dosis de $25\text{ }\mu\text{g}$ de IFN- α recombinante humano, como después de eliminar este IFN- α de la solución, lo cual se logra lavando 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 un efecto más marcado, para posteriormente, probar con este valor de voltaje, las diferentes concentraciones del IFN.

Más adelante, se realizó el segundo tipo de registros en porciones de membrana celular; en éstos, se hizo la aplicación de un pulso único de $+50\text{ mV}$, se caracterizaron las corrientes, se agregaron los agentes bloqueadores de los canales de sodio y potasio y por último se añadió al líquido de perfusión diferentes concentraciones de IFN- α humano recombinante, éstas oscilaron entre 1.9 y $39.5\text{ }\mu\text{g}$, en un volumen de $10\text{ }\mu\text{l}$. Durante la aplicación de cada una de estas dosis (5 seg), se registraron las corrientes de calcio correspondientes.

11. Manejo de datos

El análisis de datos extracelulares consistió en determinar la frecuencia de descarga cada 4 seg , de cada una de las neuronas registradas, tanto en condiciones controles como durante y después de la aplicación de alguno de los fármacos (IFN- α , GABA y GLU) Con estos datos se realizaron histogramas de frecuencia y se determinó el efecto de los fármacos con respecto a la actividad basal. Finalmente, se analizó el patrón y morfología de respuesta de los potenciales de acción de las neuronas registradas. Con los datos obtenidos de las diferentes aplicaciones de los neurotransmisores se realizaron curvas dosis-respuesta comparativas entre los diferentes fármacos.

Por otra parte, las corrientes de calcio registradas en las porciones de membrana fueron analizadas en base a su intensidad y patrón característico. Con estos valores se realizaron las curvas de Voltaje contra Corriente, así como las curvas dosis-respuesta correspondientes. Cualquier efecto se mostró como un decremento o incremento en las corrientes expresado como porcentaje de cambio con respecto a la situación basal o control.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION

Se registró la actividad eléctrica de 24 rebanadas de hipotálamo lateral de rata en condiciones basales. Los registros realizados mostraron un patrón de actividad, el cual comparativamente con la actividad registrada en animales íntegros fue de 3 a 4 veces más lenta. Siempre se presentó una dependencia de la frecuencia de descarga con la temperatura de la solución de perfusión y con la oxigenación de la misma. Frecuentemente, los registros consistían de actividad multiunitaria (actividad de varias neuronas), por lo que fue necesario utilizar una ventana discriminadora para separar tal tipo de actividad y registrar sólo aquellas señales que rebasaran el voltaje determinado para evaluar sólo una espiga. La actividad eléctrica basal (ruido) sobre la cual se incluían las espigas, constaba de pequeñas ondas de bajo voltaje (500 mV) y alta frecuencia, sin algún patrón representativo. Este tipo de actividad no sufrió modificación alguna por la maniobra experimental. La proporción de la relación en tamaño espiga-ruido fue de aproximadamente 3 a 1, por lo que fue relativamente fácil establecer el nivel de ventana de tal actividad.

Se registraron 24 espigas en las que se analizó el efecto de la aplicación del IFN- α . En la actividad basal espontánea, estas espigas mostraron una frecuencia de descarga que oscilaron de 1.4 a 11.6, con un promedio de 4.9 ± 2.3 espigas por segundo. Se trató de espigas únicas, trifásicas (negativa-positiva-negativa) sin un patrón de descarga representativo.

La aplicación de IFN- α a la solución de perfusión, se asoció con un decremento significativo en la frecuencia de descarga en el 90% de estas neuronas. Este efecto mostró una latencia de aproximadamente 2 min, y se presentó en una forma paulatina (Fig 15), hasta alcanzar un efecto máximo, lo cual ocurre aproximadamente 4 min después de agregada la citocina. La duración del efecto siempre sobrepasó el tiempo de administración del IFN- α . En la mayoría de los registros este efecto se mostró hasta 5 min después de eliminar a la citocina de la solución.

En el 50% de los casos, se observó un rebote de la actividad; esto es, después de la depresión provocada por el IFN- α , y una vez que éste se retiró de la solución de perfusión, la actividad eléctrica mostró ahora un incremento importante por encima del nivel que se observó en la situación basal. Este efecto mostró una duración de aproximadamente 4 min, de aparición y desaparición gradual, y una intensidad que rebasó a la observada durante la actividad basal en aproximadamente el 35%. La recuperación de la actividad, como consecuencia de este efecto de rebote, también se mostró en forma gradual y paulatina.

En la mayoría de las células registradas, y una vez que el efecto de rebote terminó, la actividad eléctrica tendió a volverse irregular y mostró oscilaciones importantes durante el resto del registro (Fig. 15). En muy pocas células, el nivel de descarga en este período fue similar al observado durante la fase basal; en la mayoría de neuronas, el nivel estuvo por arriba del observado en la fase control. Este incremento osciló desde un 13% hasta un 100%, por arriba de la actividad basal (Cuadro 3)

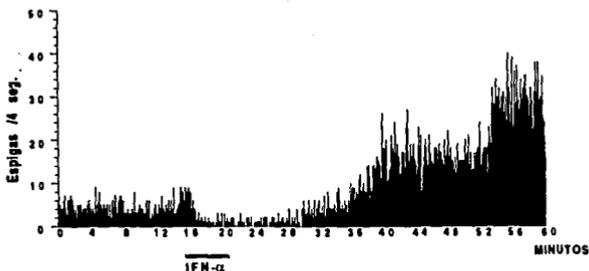


Fig. 15. En este histograma de frecuencias se observa el efecto de la adición de una dosis de IFN- α sobre la frecuencia de descarga extracelular de una neurona hipotalámica registrada en una rebanada de cerebro. La adición de esta citocina se asoció con un decremento de la frecuencia de descarga de esta neurona, la cual se prolongó más allá del tiempo de aplicación. Esta citocina modificó además la frecuencia basal de la neurona la cual se tornó sumamente irregular.

Cuadro 3. Resumen de los efectos ejercidos por el IFN- α , el GABA y el GLU sobre la frecuencia de descarga celular de las neuronas hipotalámicas registradas en el presente estudio.

FARMACOS	N	RESPUESTA			
		↑	↓	—	
IFN- α 1500 UI	24	1	22	1	EFFECTO REBOTE (50%)
VEHICULO (ALBUMINA 2%)	10	0	0	10	
GABA 0.1 M	6	0	6	0	
GLU 0.1 M	6	6	0	0	

↑ incremento ↓ decremento — sin cambio

La administración de IFN- α , no sólo provocó cambios en la frecuencia de descarga de estas neuronas, parámetros como el patrón, la duración y el tamaño de estas señales eléctricas también fueron afectadas por esta citocina. Tanto la intensidad como la duración de las señales fue decreciendo conforme se aplicó esta citocina, los efectos se iniciaron después de 2 min (Fig. 16, 3) y persistieron hasta 8 min después de aplicado el IFN- α (Fig. 16, 7). El mayor efecto se mostró aproximadamente a los 5 min (Fig. 16, 6) y consistió en una reducción del 60% del tamaño de la espiga, con una desaparición de la tercer onda (negativa). A los 8 min, la intensidad se recuperó en casi el 100% y reapareció la tercera onda negativa, aunque su morfología difería ligeramente de su condición inicial (Fig. 16, 1).

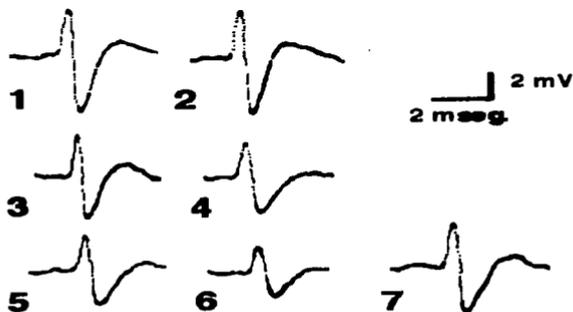


Fig. 16. La aplicación del IFN- α también indujo efectos sobre la morfología de las señales eléctricas registradas extracelularmente. El cambio más importante fue un decremento en el tamaño y en el patrón de tales señales.

Las adiciones de GLU y GABA a la solución de perfusión, de 12 rebanadas de hipotálamo, diferentes a las analizadas sólo con IFN- α , provocaron en todas las neuronas registradas, un incremento y un decremento, respectivamente, de la frecuencia de descarga neuronal. Cuando estos fármacos se aplicaron antes de añadir el IFN- α , su efecto fue dependiente de la dosis y de inmediata aparición; además la duración del mismo se observó únicamente durante el tiempo que duró su aplicación (Figs. 17 y 18). Sin embargo, cuando se agregaron estas sustancias después de añadir el IFN- α a la solución de perfusión, se observó una potenciación de la acción mostrada por cada fármaco; es decir, a la misma dosis los incrementos mostrados por el GLU o las depresiones observadas por el GABA fueron mayores en intensidad y duración que las observadas antes de la aplicación del IFN- α (Figs. 17 y 18). En estas condiciones también fue posible observar un efecto de rebote y el incremento de la irregularidad en la actividad espontánea basal (Figs. 17 y 18).

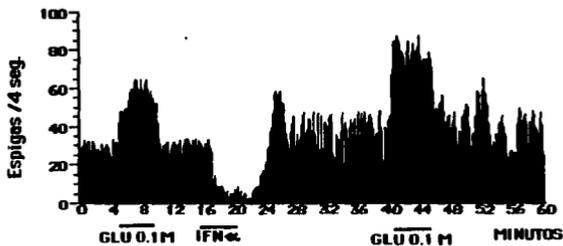


Fig. 17. Histograma de frecuencias que muestra el efecto potenciador del IFN- α sobre la respuesta excitadora del GLU en una neurona de hipotálamo lateral. La administración de GLU, previa al IFN, provoca un incremento de la frecuencia de descarga que sólo se manifiesta durante su aplicación; sin embargo, cuando éste se aplica después del IFN, entonces su acción es mucho más intensa y se prolonga más allá del tiempo de su administración.

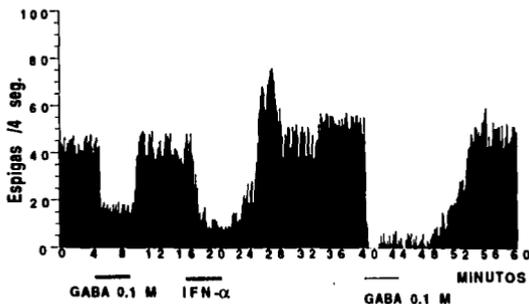


Fig. 18. De igual forma la aplicación de IFN- α provocó un efecto potenciador sobre las acciones inhibitorias del GABA en estas mismas neuronas, tal y como se observa en el presente histograma de frecuencias.

En lo relacionado a los registros de fijación de voltaje en porciones de membrana aislada, éstos se realizaron en 35 células de rebanadas de HL. Estas células fueron ligeramente disociadas de los tejidos circundantes por medio de "chorros" de solución. Una vez realizado un sello de alta resistencia, se fijó el potencial de membrana en un valor de -80 mV. Posteriormente, se registraron las corrientes iónicas provocadas por la aplicación de un pulso de intensidad creciente. Este pulso, con 80 mseg de duración y 5 Hz de frecuencia, se inició con una intensidad de $+10$ hasta $+100$ mV.

En la Fig 19, se muestra un ejemplo del resultado de aplicar tal tipo de pulsos en células que no fueron sometidas a tratamiento farmacológico alguno (Registros control). Se observa una secuencia de 10 trazos, que representan el efecto de cada uno de los pulsos.

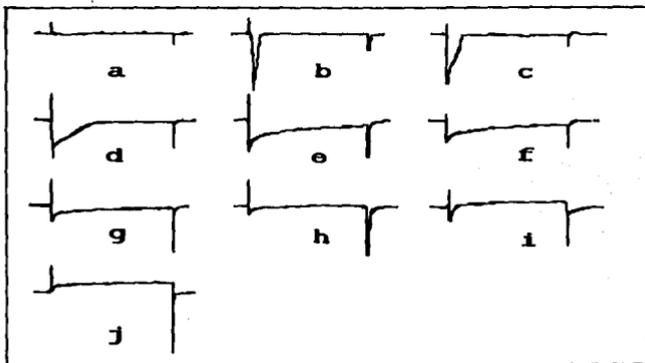


Fig. 19. Registros representativos de las diferentes corrientes iónicas que presentaron las células hipotalámicas laterales típicas. En estos registros, donde las corrientes no están aún disociadas, se observan componentes que dependen del sodio, potasio y calcio.

En el registro **a** se aplicó un pulso depolarizante de $+10$ mV y se observa el momento de la aplicación y retiro del pulso, representado por las corrientes "capacitivas" de la membrana celular. No se aprecian desviaciones de la línea basal, la cual corresponde a 0 pA de corriente, lo que implica que este pulso no indujo corriente alguna.

En **b** se observa la presencia de una corriente entrante de gran intensidad (-360 pA), seguida por una corriente saliente que retorna esta corriente a un nivel de 0 . Estas corrientes se manifiestan con la aplicación de un pulso de 20 mV y corresponden al paso del ión sodio, entrante, y del ión potasio, saliente, a través de la membrana celular, lo cual ocurre con una duración de 9 mseg. Tal fenómeno se relaciona directamente con la generación de un potencial de

acción. Una vez transcurrido este suceso, la corriente retorna al valor de referencia.

En c se aplicó un pulso de 30 mV, el cual genera una corriente de sodio similar a la anterior, aunque de aparición más rápida y menor intensidad (-300 pA). La corriente saliente también se modifica, se vuelve más lenta y muestra un punto de rectificación. Lo cual indica que hay al menos dos tipos de corrientes involucradas en esta parte del registro. En este caso particular se trata de una corriente saliente de potasio, la cual se adiciona a una pequeña corriente entrante de calcio.

La situación en el registro d cambia significativamente. La corriente de sodio disminuyó considerablemente (-240 pA), al igual que la corriente saliente de potasio, mientras que la correspondiente al calcio se incrementó. Debido a los valores de voltaje utilizados, esta última se relaciona con la apertura de los canales de calcio de tipo LVA, es decir aquellos que se activan con un voltaje bajo.

Los cambios más importantes observados en el registro e, son una mayor disminución de la corriente de sodio (-200 pA), acompañada de una reducción de la corriente de potasio con un incremento significativo en la duración e intensidad de la de calcio. Muy probablemente este incremento en las corrientes de calcio se debió a la incorporación de las corrientes HVA, que resultan de aplicar un pulso con la intensidad del que provocó esta respuesta.

Las corrientes de calcio son la más evidentes en la porción f de esta figura. La corriente de sodio se ha reducido hasta ser de sólo -140 pA. Mientras que las corrientes de calcio presentan la mayor duración e intensidad del registro. Cabe mencionar que cuando se aplican pulsos que llevan el potencial de membrana a valores de -30 y -20 mV, (e y f), las corrientes de calcio se observan en su máxima intensidad de tamaño y duración.

En el registro g, cuando el voltaje alcanzó los -10 mV, se registró una corriente de sodio muy pequeña, de aproximadamente -100 pA; mientras que la corriente de calcio continuaba presente durante todo el tiempo de aplicación del pulso, pero con menor intensidad que en los anteriores registros.

Al aplicar un pulso de intensidad suficiente para llevar el voltaje de la membrana a cero, como ocurrió en el registro h, solamente se observan las corrientes capacitivas de la membrana y una pequeña corriente entrante de sodio (-60 pA). En este caso, el nivel de corriente de la membrana está muy próximo a cero, lo que indica la ausencia de corrientes de calcio.

Por el contrario en los registros i y j, los cuales corresponden a la aplicación de un pulso de 90 y 100 mV, respectivamente, hay una inversión de la corriente; es decir, la corriente se torna positiva, lo que indica una corriente positiva saliente. Si esto corresponde al ión calcio, esto indicaría la salida del calcio del interior de la célula. Como se observa en las figuras, el tamaño de la corriente positiva es dependiente de la intensidad del pulso (Fig. 19).

En cada uno de los registros se aprecia un pico invertido que se relaciona con el momento en que termina el pulso. Este pico, conocido como "corriente de cola" (tail current), aumenta conforme se incrementa la intensidad del pulso y representa una de las corrientes capacitivas de

la membrana celular, aunado al ruido eléctrico que provoca el cierre de los canales iónicos.

El resto de las neuronas registradas mostraron una actividad similar a la anterior al aplicarles los mismos pulsos depolarizantes.

Cuando se adicionó IFN- α a la solución de perfusión se provocaron cambios significativos en estas corrientes, la figura 20, muestra lo que ocurre en tal situación. Además de añadir 1,500 UI de IFN- α , se mantuvo una concentración 1 μ M de Tetrodotoxina, con la finalidad de bloquear los canales de sodio y CsCl para bloquear los canales de potasio.

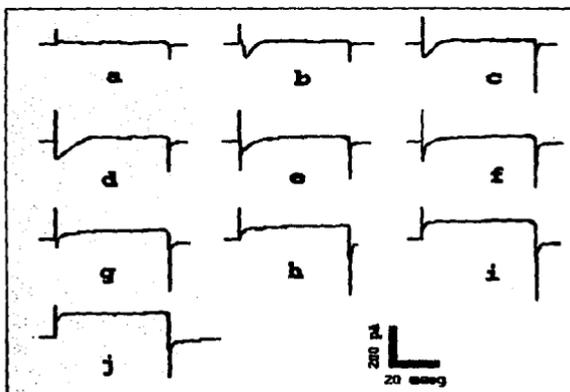


Fig. 20. La adición del IFN- α a la solución de perfusión, provocó una disminución significativa de las corrientes de calcio en estas neuronas, tal y como se observa en este registro representativo.

En la porción a de la figura, se observa que la aplicación de un pulso de 10 mV, únicamente provoca las corrientes capacitivas de entrada y salida del pulso, sin inducir alguna otra corriente significativa.

Cuando el valor del pulso es de +20 mV, como ocurrió en b, se genera una pequeña corriente entrante de calcio, de aproximadamente -80 pA, la cual se corresponde, por las características del voltaje, con la activación de los canales de calcio de tipo LVA. Esta corriente sólo se observa en b, c y d, y se reduce considerablemente en e; es decir, cuando el voltaje de activación alcanza un valor de potencial de membrana cercano a -40 mV. En estos registros es la única corriente que se observa.

Los registros f, g, h, i, y j, se caracterizan por mostrar una corriente positiva, por arriba del valor potencial 0, la cual refleja las características temporales y de intensidad del pulso de activación. En ninguno de estos registros es posible observar corrientes de calcio debidas a la activación de canales de tipo HVA, las cuales deberían aparecer con la aplicación de pulsos depolarizantes de +40 a +50 mV, lo que correspondería a las porciones d y e de la figura. Las corrientes observables desde f hasta j, posiblemente correspondan a corrientes de potasio y quizá a algunas corrientes salientes de calcio (Fig. 20). Los resultados mostrados en esta figura sugieren que el IFN- α es capaz de bloquear las corrientes de calcio dependientes de la actividad de los canales HVA. Los registros de esta figura provienen de una sola neurona; éstos son representativos de lo ocurrido en las restantes 34 neuronas registradas.

En la figura 21, se muestra la curva voltaje-intensidad de este efecto. Esta curva se realizó con los promedios y error estándar que mostraron las 35 neuronas registradas. La principal acción del IFN- α se alcanza cuando los valores de voltaje de la membrana se encuentran cercanos a 0 mV, y su efecto se reduce cuando los valores se dirigen hacia ambos extremos. En esta gráfica también se muestra que el efecto del IFN- α , va más allá del tiempo de su aplicación. Después de lavar el tejido y esperar durante al menos 15 minutos de retirada de la citocina, las corrientes de calcio a través de canales HVA, no se han recuperado del todo.

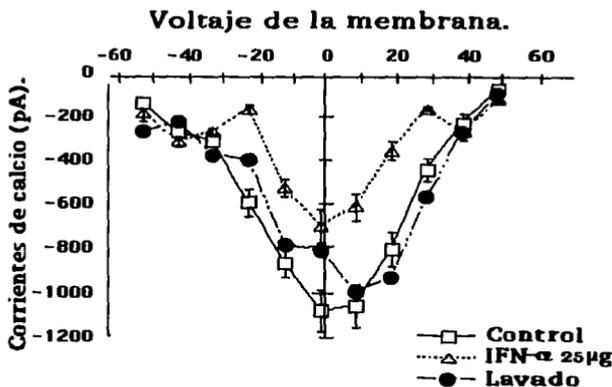


Fig 21. La curva corriente-voltaje de estas neuronas sufrió una modificación importante cuando se adicionó el IFN- α a la solución de perfusión. Este efecto fue más importante cuando los valores de voltaje de la membrana celular se encontraban cercanos a 0 mV. Cuando se retiró el IFN- α y se hizo un lavado del tejido, los valores de la corriente no retornaron a los valores controles.

La figura 22 muestra este efecto del IFN- α con mayor detalle. En ella se han sobrepuesto 3 registros, el primero (a), un registro control donde se observan las corrientes de calcio provocadas por un pulso de activación de +50 mV, lo que indica que estas corrientes son de tipo HVA. El segundo registro (b), corresponde a la misma corriente pero ahora en presencia del IFN- α ; mientras que el tercer registro (c), se realizó después de 10 min de haber lavado el tejido. Aunque se observa cierto grado de recuperación, ésta no fue total durante este lapso.

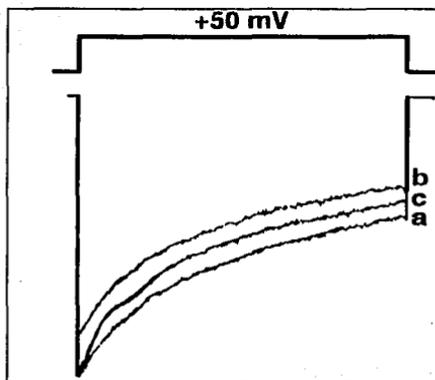


Fig. 22. Los tres registros sobrepuestos de esta figura, muestran el papel depresor del IFN- α sobre las corrientes de calcio (b). También muestran que la eliminación de la citocina de la solución de perfusión, como ocurrió en (c), no provoca una recuperación de las mismas al nivel de las corrientes controles (a).

La gráfica de la figura 23, muestra el mismo efecto pero expresada en forma de un histograma, en ella se observa que la corriente de calcio control, la cual fue de 1150 pA, se redujo hasta 740 pA en presencia del IFN- α , y regresó sólo a 900 pA, después de lavar la preparación.

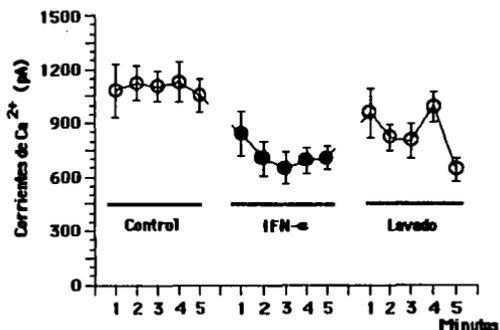


Fig. 23. La aplicación del IFN- α provocó cambios de larga duración, los cuales persistieron incluso después de varios minutos de retirada la citocina de la solución. En este ejemplo, se muestra que aún después de lavado el IFN, su efecto depresor de las corrientes de calcio se mantiene por varios minutos más.

En la figura 24, se muestra el efecto de agregar diferentes concentraciones de IFN- α a la solución de perfusión. En este caso se registró el efecto de un pulso de activación de +50 mV. Los registros están sobrepuestos para delimitar con mayor exactitud el efecto del IFN- α sobre esta corriente de calcio de tipo HVA. Se observa que todas las concentraciones de esta citocina, provocan una reducción tanto de la corriente pico, como de la corriente tardía; es decir, de la corriente que se activa al momento de aplicar el pulso, como de la corriente resultado de retirar el pulso de activación.

Por último, en el cuadro 4 se muestra en porcentajes, el valor de esta inhibición para cada una de las concentraciones de IFN- α utilizadas. Así, la dosis mayor (39.5 μ g), provocó una reducción del 38% de estas corrientes, mientras que la dosis menor (1.9 μ g), sólo redujo en un 8% tales corrientes. El efecto del IFN- α sólo ocurrió sobre las corrientes de calcio de tipo HVA, sin afectar, en forma aparente, algún otro tipo de corriente diferente a la de calcio. Además, los efectos de esta citocina siempre fueron de larga duración, prolongándose más allá del tiempo de su aplicación.

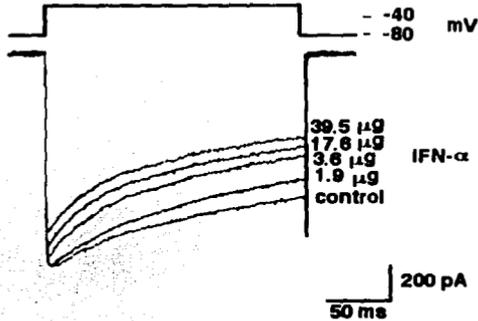


Fig. 24. Los efectos depresores del IFN- α son dependientes de la concentración del mismo. El efecto máximo se observó con una dosis que equivale a una concentración de 39.5 μg de la citocina, lo cual provocó una depresión próxima al 40% del valor de la corriente control.

Cuadro 4. Resumen de los efectos, expresados en porcentaje, del IFN- α sobre las corrientes de calcio de las neuronas hipotalámicas laterales.

DOSIS DE IFN- α	DISMINUCIÓN DE LAS CORRIENTES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE
1.9 μg	8 %
3.6 μg	12 %
17.6 μg	22 %
39.5 μg	38 %
CONTROL	0 %

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el IFN- α posee la capacidad de modificar la actividad eléctrica de las células del HL. Los efectos sobre respuestas como el potencial de acción, o las corrientes iónicas de la membrana celular, son el mecanismo subyacente de las acciones neurológicas descritas en pacientes tratados con esta citocina. Las concentraciones utilizadas de IFN- α en el presente trabajo, son similares a las encontradas en algunas condiciones patológicas y fisiológicas (1,49), lo cual sugiere que estos efectos pueden desencadenarse como una situación natural en esas mismas condiciones.

Un punto importante por describir consiste en el mecanismo de acción a nivel de la membrana celular, que utiliza el IFN- α para producir tales efectos. El IFN es una citocina con propiedades específicas de especie; esto es, sus efectos antivirales, antitumorales e inmunomoduladores, los cuales dependen de los receptores descritos para el IFN- α , sólo pueden ser ejercidos cuando el IFN aplicado proviene de la misma especie del animal al que se lo aplica (25). Sin embargo, los efectos sobre la actividad eléctrica, la ingesta de alimento, la temperatura corporal basal, así como sus acciones sobre el sueño, entre otros, no son específicos de especie; estos se logran cuando se aplica IFN humano en roedores como la rata y el conejo (18,52,63). Tal consideración indica que se trata de dos tipos diferentes de receptores. Los receptores que median sus efectos inmunológicos o de índole genómico, son aquellos en los que participan el sistema de proteínas Janus kinasas; mientras que los receptores que median sus efectos neurológicos, son aún desconocidos. Debido a que algunos de estos efectos pueden ser bloqueados por naloxona o modificados por alguna opiopeptina, se sugirió que tales receptores pudiesen ser de índole opioide. Sin embargo, tal sugerencia cada vez es más controversial y menos aceptada (64).

Independientemente de la naturaleza de tales receptores, los efectos inducidos por el IFN- α son específicos en cuanto se manifiestan en forma selectiva y afectan un tipo especial de corriente de calcio. Falta aclarar si estos efectos constituyen una etapa inicial de los efectos genómicos inducidos por esta citocina.

Las acciones del IFN- α sobre la actividad eléctrica de las neuronas de rebanadas de hipotálamo lateral, son diferentes a las reportadas en animales íntegros registrados en esa misma región hipotálamica. En este caso en particular, observamos en la gran mayoría de neuronas registradas un decremento muy significativo de la frecuencia de descarga de estas neuronas; mientras que en los estudios de animales íntegros, las respuestas muestran una mayor variabilidad en el efecto provocado. Es muy probable que estas discrepancias dependan básicamente del tipo de preparación. De hecho, desde el inicio de la actividad espontánea, la frecuencia basal de descarga en animales íntegros esta por encima de la observada en este estudio.

Es necesario considerar, que al realizar un estudio en rebanadas de cerebro, limitamos seriamente el número de entradas y salidas que una neurona posee; y por lo tanto, evitamos influencias eléctricas de otras estructuras que pueden ser provocadas por la administración sistémica del fármaco. Por otra parte, el observar un efecto farmacológico en estas neuronas "aisladas", indica un efecto directo de este fármaco sobre la membrana celular de las mismas.

El hecho de que en las neuronas aisladas de hipotálamo, el interferón ejerza un efecto significativo en una dosis comparativa a la fisiológica, sugiere fuertemente que el hipotálamo lateral es un sitio blanco para las acciones neurológicas de esta citocina. Los efectos registrados y provocados por el interferón, son también muy diferentes a las acciones provocadas por múltiples fármacos y neurotransmisores localizados en esta estructura. Inicialmente durante las aplicaciones directas de estas sustancias sobre estas neuronas, es común encontrar un efecto de aparición inmediata (cuestión de 1 a 2 seg), y finalización súbita, en la acción de estos compuestos. En el caso del IFN- α , la situación fue muy diferente, el inicio del efecto ocurrió con una latencia mayor a los 45 segundos y su efecto siempre rebasó el tiempo de permanencia de la citocina en la solución de perfusión, por varios minutos.

Adicionalmente, el hecho de que los efectos inducidos por el GLU o el GABA se potenciaron después de la aplicación del IFN- α , indica que esta citocina ejerce efectos de larga duración, sobre la actividad de la membrana celular. Desconocemos aún la cinética de tales efectos, en cuanto al tiempo requerido para su presentación, la duración de tal efecto, y su extensión hacia otras sustancias diferentes al GLU o al GABA; además de los mecanismos a nivel de la membrana celular o intracelulares intermediarios de tales efectos. Debido a que estas acciones mostraron una latencia próxima a los 30 minutos es probable que se trate de acciones no-genómicas provocadas por el IFN- α . De igual manera, aún desconocemos la repercusión fisiológica de tales efectos de potenciación provocados por la citocina.

Los estudios realizados en porciones de membrana celular con fijación de voltaje, mostraron que el IFN- α es capaz de bloquear en forma específica una corriente de calcio especial. La acción de la citocina parece centrarse sobre las corrientes iónicas desencadenadas por la apertura de los canales de tipo HVA. Estos canales, los cuales son insensibles a las piridinas y sensibles a la ω -conotoxina, parecen ser fundamentales para el mantenimiento de la concentración intracelular de calcio libre (21). A su vez, tal concentración es fundamental en el desempeño de múltiples acciones celulares, las cuales van desde fenómenos de corta duración, como la secreción hormonal o de neurotransmisores, hasta procesos muy complejos y de larga duración como la diferenciación y el crecimiento celular (48).

La concentración intracelular de calcio ha sido invocada como un mecanismo que modula y regula en su conjunto toda la fisiología celular (21). Cuando se aplican sustancias o procedimientos, como la despolarización crónica o la aplicación de potasio, los cuales son capaces de modificar tal concentración, se provocan profundos efectos sobre el grado de desarrollo y diferenciación celular (73). En este contexto, los efectos de larga duración de cualquier sustancia sobre los flujos de calcio hacia el interior celular, revisten una importancia fundamental en el proceso de regulación y modulación de la función celular.

En el presente trabajo, con la información descrita, no es posible aún el referirnos a un mecanismo probable de acción a nivel de la membrana celular por parte del IFN- α ; es decir desconocemos si el efecto se debió a la asociación de esta citocina con la proteína canal de tipo HVA, o se trata de un efecto mediado por algún sistema de transducción intracelular. A pesar de ello, sí observamos efectos de larga duración del IFN- α sobre las corrientes de calcio. Este efecto, al igual que el observado sobre la actividad eléctrica extracelular, se manifestó tiempo después de retirar el IFN, ya que al lavar la preparación, y con ello el retirar el IFN- α de la solución, las corrientes de calcio aún no regresaron a su nivel original.

En nuestras condiciones, no fue posible realizar registros por varias horas para determinar el tiempo que le llevaría a la preparación en retornar a las condiciones originales. Tal proposición continúa como un plan de trabajo.

Desde este punto de vista es muy probable que algunos de los efectos del IFN- α sobre los procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación neuronal, descritos en la literatura científica internacional, sean consecuencia de un efecto sobre los canales de calcio. Es posible entonces que el IFN- α posea acciones sobre los parámetros celulares reservados a los factores de crecimiento y diferenciación celular, lo que implicaría que su papel fisiológico va más allá, que la de ser una sustancia inmunomoduladora o incluso un puente de unión y/o asociación entre el sistema nervioso central y el sistema inmune.

Dentro de la estrategia de investigación de esta línea, resulta importante; primero, el intentar definir un mecanismo de acción a nivel de la membrana celular. Es necesario saber si en este efecto está involucrada, la participación de los sistemas de proteínas Janus kinasas, o algún otro tipo de mecanismo de transducción intracelular. En particular resulta importante analizar a los sistemas de proteínas G, ya que éstas han sido ligadas muy estrechamente con los mecanismos de regulación del calcio intracelular (5). También resulta importante el describir la cinética de la asociación entre el IFN- α y la membrana celular. La descripción de tal interacción, nos permitirá definir la existencia de un posible receptor, diferente al receptor del IFN- α hasta ahora descrito. Resultaría importante además, el determinar la existencia de algún mecanismo opiode implicado en tal efecto.

Otro de los puntos claves que es necesario aclarar, se relaciona con la cinética del efecto. En otras palabras, debemos definir el tiempo de aparición del efecto potenciador del IFN- α sobre las respuestas al GLU y GABA, determinar si este efecto puede ser extensivo hacia otros compuestos, y definir que tanto persiste tal acción ya sea en presencia o ausencia de esta citocina. De igual manera resulta indispensable el determinar si estos efectos dependen del tiempo de incubación de la preparación con el IFN.

En el caso de los estudios en porciones de membrana, decididamente necesitamos describir con exactitud la dinámica de sus efectos sobre las corrientes de calcio. Para ello es necesario utilizar una herramienta farmacológica que nos permita determinar con exactitud, tanto los valores de voltaje de apertura de tales canales, como su sensibilidad a los fármacos bloqueadores de canales de calcio característicos. Uno de los problemas a resolver en este capítulo, es la definición de las corrientes de calcio en este sitio cerebral. Estas corrientes son diferentes dependiendo del grupo celular que se trate, por lo que inicialmente siempre es necesario determinar la cinética de los mismos en cada grupo celular. En el caso de las neuronas del HL, debido a su heterogeneidad, no existe una definición clara de tales corrientes, por lo que antes de ensayar cualquier tipo de procedimiento experimental, es necesario determinar y definir tales corrientes.

Los resultados descritos en el presente trabajo, son bastante prometedores en el sentido de interpretar y conocer la participación fisiológica de una sustancia, de relativa reciente aparición en el campo de la neurobiología, sustancia que por otro lado, promete un futuro esperanzador en el tratamiento de múltiples enfermedades, pero que requiere antes que nada, la descripción detallada de su Fisiología y Farmacología.

CONCLUSIONES.

Los resultados observados en el presente trabajo nos permiten concluir:

- 1.- La aplicación del IFN- α induce efectos importantes sobre la actividad eléctrica de las neuronas hipotalámicas, tales como la disminución significativa de la frecuencia de descarga y de la morfología y patrón de las señales eléctricas registradas.
- 2.- Este efecto, el cual se produce en concentraciones que pueden considerarse como fisiológicas, sugiere que esta citocina está involucrada en los procesos de regulación neural hipotalámicos, los cuales posiblemente se amplifiquen en condiciones patológicas.
- 3.- El efecto del IFN- α sobre la excitabilidad neuronal, parece ser consecuencia de su acción a nivel de membrana celular, donde esta citocina es capaz de bloquear los canales de calcio dependientes de voltaje del tipo HVA, lo que se traduce en una reducción de las corrientes de este ión.
- 4.- Este efecto implica que el IFN- α puede estar participando en los procesos de regulación y entrada a largo plazo, del ión calcio al interior de la neurona. Gracias a esta participación, la citocina puede ser considerada como un factor que regule y module procesos celulares como el crecimiento celular y la diferenciación. Tal enfoque explicaría algunos de sus efectos sobre la proliferación o el crecimiento de algunos tipos de tumores.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbott, R. J.; Bolderson, I.; Gruer, P. J. K. Assessment of an immunoassay for interferon-alpha in cerebrospinal fluid as a diagnostic aid in infections of the central nervous system. *J. Infect. Dis.* 15:153-160;1987.
2. Ackerman, S. K.; Hochstein, H. D.; Zoon, K.; Browne, W.; Rivera, E.; Ellsberg, B. Interferon fever: Absence of human leucocytic pyrogen response to recombinant α -interferon. *J. Leucocyte Biol.* 36:17-25; 1984.
3. Adams, F.; Quesada, J. R.; Gutterman, J. V. Neuropsychiatric manifestations of human leucocyte interferon with cancer. *JAMA* 252:938-941;1984.
4. Aguet, M. High affinity binding of 125 I-labelled mouse interferon to specific cell surface receptors. *Nature* 284:459-461; 1980. *Infect. Dis.* 15:153-160; 1987.
5. Axelrod, J.; Phospholipase A_2 and G proteins. *TINS* 18:64-65, 1995.
6. Billiau, A. The interferon system as a basis for antiviral therapy or prophylaxis. *Antiviral. Res. Suppl.* 1:131-137; 1985.
7. Blalock, J. E.; Harp, C. Interferon and adrenocorticotrophic hormone induction of steroidogenesis, melanogenesis and antiviral activity. *Arch. Virol.* 67:45-49; 1981.
8. Blalock, J. E.; Smith, E. M. Human leucocyte interferon (Hu-IFN- α): Potent endorphin-like opioid activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101:472-478; 1981.
9. Blalock, J. E.; Smith, E. M. Human leucocyte interferon. Structural and biological relatedness to adrenocorticotrophic hormone and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:5972-5974; 1980.
10. Blalock, J. E.; Stanton, J. D. Common pathways of interferon and hormonal actions. *Nature* 283:406-408; 1980.
11. Cassatella, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today* 16:21-27; 1995.
12. Chang, J. Y.; Martin, D. P.; Johnson, E. M., Jr. Interferons can prevent sympathetic neuronal death induced by NGF deprivation. *Soc. Neurosci. Abstr.* 15:438;1989.
13. 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
14. Dafny, N. The hypothalamus exhibits electrophysiologic evidence for morphine tolerance and dependence. *Exp. Neurol.* 77:66-67;1982.
15. Dafny, N.; Prieto-Gómez, B.; Reyes-Vázquez, C. Does the immune system communicate with the Central Nervous System? Interferon modifies central nervous activity. *J. Neuroimmunol.* 9:1-12;1985.
16. Dantzer, R.; Kelley, K. W. Stress and Immunity: An integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sci.* 44:1995-2008;1989.

17. De Maeyer, E.; de Maeyer-Guignard, J. Interferons. In: *The Cytokine Handbook*. Academic press Inc. 1991: pp 215-239.
18. De Sarro, G. B.; Masuda, Y.; Ascloti, C.; Audino, M. G.; Nistico, G. Behavioural and ECoG spectrum changes induced by intracerebral infusion of interferons and interleukin 2 in rats are antagonized by naloxone. *Neuropharmacol.* 29: 167-179; 1990.
19. Dinarello, C. A.; Bernheim, H. A.; Duff, G. W.; Le, H. V.; Nagabhusan, T. L.; Hamilton, N. C.; Coceani, F. Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon. *J. Clin. Invest.* 74:906-913; 1984.
20. Dinarello, C. A.; Mier, J. W.; Lymphokines. *N. Eng. J. Med.* 317:940-945; 1987.
21. Dunlap, K.; Luebke, J. I.; Turner, T. J. Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *TINS* 18:89-98; 1995.
22. Erkman, L.; Wuarin, L.; Cadelli, D.; Kato, C. Interferon induces astrocyte maturation causing an increase in cholinergic properties of cultured human spinal cord cells. *Dev. Biol.* 132:375-388; 1989.
23. Fent, K.; Zbinden, G. Toxicity of interferon and interleukin. *TIPS* 8:100-105; 1987.
24. Fridrik, M.A. Interferon-alpha therapy in non-Hodgkin's lymphoma. *Wien. Med. Wochenschr.* 143:429-434; 1993.
25. Gillespie, D.; Carter, W. A. Species Specificity of Interferon. *Tex. Rep. Biol. Med.* 41:36-42; 1982.
26. Goldstein, A.; Schulz, R. Morphine tolerant longitudinal muscle strips from guinea pig ileum. *Br. J. Pharmac.* 48:655-666; 1973.
27. Gresser, I. Effects of interferon in vivo. In: *The Biology of Interferon System*. de Maeyer, E.; Galasso, G.; Schellekens, H. (eds.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1981: pp 141-147.
28. Gresser, I.; Calvet, M. C. Interferon enhances the excitability of cultured neurones. *Nature* 178:558-560; 1979.
29. Gresser, I.; Tovey, M. G.; Maury, C.; Chourouhliok, I. Lethality of interferon preparations for newborn mice. *Nature* 258:76-78; 1975.
30. Guyton, A. C. *Tratado de Fisiología Médica*. Ed. Interamericana McGraw-Hill, 8a. edición, España, 1992: pp 684-685.
31. Heremans, H.; Billiau, A.; Colombatti, A.; Hilgers, J.; De Somer, P. Interferon treatment of NZB mice: Accelerated progression of autoimmune disease. *Infect. Immun.* 21:925-930; 1978.
32. Hill, R. G.; Mitchel, J. F.; Pepper, C.M. The excitation and depression of hippocampal neurons by iontophoretically applied enkephalins. *J. Physiol. (Lond)* 272:50-51, 1976.

33. Hori, T., Nakashima, T., Take, S., Katsuka, Y., Mori, T., Katafuchi, T. Immune Cytokines and regulation of body temperature, food intake and cellular immunity. *Brain Res. Bull.* 27:309-313; 1991.
34. Hull, K. R.; Ibric, L. L. V. Astrocyte responses to EGF and cytokine interactions. *Soc. Neurosci. Abstr.* 15:511; 1989.
35. Iomoto, K.; Ion Channels: molecular basis of ion selectivity. *FEBS.* 325:100-103; 1993.
36. Isaacs, A.; Lindenmann, J.; Virus Interference. *The Interferon. Proc. R. Soc. Ser. B.* 147:258; 1957.
37. Johnson, H. M.; Bazer, F. W.; Szente, B. E.; Jarpe, M. A. How interferons fight disease. *Sci. Amer.* 270: 40-47; 1994.
38. Johnson, H. M.; Torres, B. A.; Smith, E. M.; Dion, L. D.; Blalock, J. E. Regulation of lymphokine (γ -interferon) production by corticotropin. *J. Immunol.* 132:246-250; 1984.
39. Katafuchi, T.; Hori, T.; Take, S. Central administration of interferon- α enhances rat sympathetic nerve activity to the spleen. *Neurosci. Lett.* 125:37-40; 1991.
40. Klefer, R.; Kreutzberg G. W. Gamma Interferon-like immunoreactivity in the rat nervous system. *Neurosci.* 37: 725-734; 1990.
41. Kirchner, H. The interferon system as an integral part of the defense system against infections. *Antiviral. Res.* 6:1-17; 1986.
42. Knobler, R. Interferon-alpha in cutaneous T-cell lymphoma. *Wien. Med. Wochenschr.* 143:435-437; 1993.
43. Krishnan, R.; Ellinwood, E. H., Jr.; Laszlo, J.; Hood, L.; Ritchie, J. Effect of gamma interferon on the hypothalamic-pituitary-adrenal system. *Blol. Psychiat.* 22:1163-1166; 1987.
44. Micksche, M. New aspects of interferon therapy in malignant disease. *Wien. Med. Wochenschr.* 143:454-457; 1993.
45. Millhouse, H. A golgi anatomy of the rodent hypothalamus. in: *Anatomy of the Hypothalamus.* Morgane, P. J. and Panksepp (Eds.), *Handbook of Hypothalamus.* Marcel Dekker Inc. New York 1980: pp 223-229.
46. Minagawa, T.; Mizuno, K. Detection of high levels of immunoreactive human beta-1 interferon in sera from HIV-infected patients. *Life Sci.* 45:iii-vii; 1989.
47. Moore, R. Y. Hypothalamus. in: *Encyclopedia of Neuroscience.* George Adelman (ed), Birkhäuser Boston Inc. Vol.1, 1987: pp 517-518.
48. Morgan, J. M.; Curran, T.; Immediate-early genes: ten years on. *TINS.* 18:66-67; 1995.
49. Morganti-Kossmann, M. C.; Kossmann, T.; Wahl, S. M. Cytokine mediated neuropathology. *TIPS* 13:286-291; 1992.

ESTA COPIA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

50. Nagata, S. Stress-induced immune changes, and brain-immune interaction. *Daigaku Zasshi*. 15:161-171; 1993.
51. Nakashima, T.; Hori, T.; Kuriyama, K.; Kiyohara, T. Naloxone blocks the interferon- α induced changes in hypothalamic neuronal activity. *Neurosci. Lett.* 82:332-336; 1987.
52. Nakashima, T.; Hori, T.; Kuriyama, K.; Matsuda, T. Effects of interferon- α on the activity of preoptic thermosensitive neurons in tissue slices. *Brain Res.* 454:361-367; 1988.
53. Panitch, H.S.; Bevar, C.T., Jr.. Clinical trials of interferons in multiple sclerosis. What have we learned? *J. Neuroimmunol.* 46:155-164; 1993.
54. Pellegrini, S.; Schindler, C. Early events in signalling by Interferons. *TIBS* 18:338-342; 1993.
55. Pestka, S.; Langer, J. A.; Zoon, K. C. ; Samuel, C. E. Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* 56:727-777; 1987.
56. Plata-Salamán, C. R. Immunoregulators in the nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15:185-215; 1991.
57. Plata-Salamán, C. R. Interferons and central regulation of feeding. *Am. J. Physiol.* 263: R1222-R1227;1992.
58. Pollard, R. B. Usages of interferon and interferon inducers in man- The second half of 1980. *Med. Biol.* 59:69-76;1981.
59. Raissdana, S. S.; Barish, M. E.; Mandori, N. B.; Kerling, J. γ -interferon promotes maturation of mammalian central neurons in culture. *Soc. Neurosci. Abstr.* 15:18; 1989.
60. Reyes-Vázquez, C.; Prieto-Gómez, B. Alpha and Gamma Interferons, effects on cortical and hippocampal neurons: Microiontophoretic application and single cell recording. *Intern. J. Neurosci.* 25:113-121; 1984.
61. 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.
62. Reyes-Vázquez, C.; Prieto-Gómez, B.; Rabín, B. S. Stress-induced alterations in Interferon production and effects on central nervous system. *Intern. Brain. Immun.* 6:154-162;1992.
63. Reyes-Vázquez, C., B. Prieto-Gómez and N. Dafny. Alpha-interferon suppresses neuronal activity of the lateral hypothalamus. *Neuropharmacol.* 33(12):1529-1541, 1994.
64. Reyes-Vazquez C.; Weisbrodt, N.; Dafny, N. Does interferon exert its actions through opiate receptors. *Life Sci.* 35:1015-1021; 1984.
65. Roosth.; Pollard, R. B.; Brown, S. L.; Meyer, W. J., III. Cortisol stimulation by recombinant interferon α_2 . *J. Neuroimmunol.* 12:311-316; 1986.
66. Satoh, M.; Zieglgänsberger, W.; Herz, A. Actions of opiates upon single unit activity in the

cortex of naive and tolerance rats. *Brain Res.* 115:99-110;1976.

67. Schwarzmeier, J.D. The therapeutic effect of interferon-alpha exemplified by hairy cell leukemia. *Wien. Med. Wochenschr.* 143: 412-415; 1993.
68. Scott, G. M.; Secher, D. S.; Flowers, D. Toxicity of interferon. *Brit. Med. J.* 282:1345-1348; 1981.
69. Shibata, M.; Blatteis, C. M.; Human recombinant tumor necrosis factor and interferon affect the activity of neurons in the organum vasculosum laminae terminalis. *Brain Res.* 562:323-326; 1991.
70. Smedley, H.; Katrak, M.; Sikora, K.; Wheeler, T. Neurological effects of recombinant human interferon. *Brit. Med. J.* 286:262-264; 1983.
71. Smith, E. M.; Blalock, J. E.; A molecular basis for interactions between the immune and neuroendocrine systems. *Intern. J. Neurosci.* 38:455-464; 1988.
72. Smith, C. M.; Reynard, A. M. *Farmacologia*. Ed. Médica Panamericana, 1a edición, Buenos Aires, Argentina, 1993; pp 643.
73. Tsien, R. W.; Lipscombe, D.; Madson, D.; Bley, K.; Fox, A. Reflections on Ca²⁺-channel diversity, 1988-1994. *TINS* 18:52-54; 1995.
74. Vilcek J. Recent progress in the elucidation of interferon alfa/beta and interferon gamma actions. *Sem. Hematol.* 30: 9-10; 1993.