

11261



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO.**

**"MODULACION DE LAS CORRIENTES DE CALCIO POR EL INTERFERON- $\alpha$  EN  
REBANADAS Y CELULAS CULTIVADAS DE LA REGION DEL  
HIPOCAMPO DE RATA".**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
PRESENTA:**

**QFB. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ.**

**ASESOR**

**DR. CRUZ REYES VAZQUEZ.**

**1997.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**Mamá, Papá :**

**Por el inmenso amor que me han otorgado y por dirigir mis pasos en la vida, les ofrezco este trabajo que representa para mi el final de una meta y el principio de un camino, que espero compartir por siempre con ustedes.**

**Gracias, los AMO.**

**Erika, Ara, Pepe:**

**Gracias por confiar en mi y demostrarme su cariño en los momentos difíciles, por formar parte de mi vida de la manera en que lo hacen y apoyarme en todo.**

**Los adoro.**

Dr. Cruz:

**Gracias por confiar en mi y darme su apoyo y ejemplo durante mi trabajo y por enseñarme el valor que representa el realizar lo que uno desea.**

Dr. David:

**Le agradezco el apoyo y el tiempo que me brindo para poder realizar este proyecto y por la oportunidad de aprender cosas nuevas .**

Lidia, Miguel y Victor:

**Muchas gracias por apoyarme y darme animos en todo momento.**

**Los quiero**

**A:**

**Cristy (chispita), Belén, Dalia, José Luis, Ma. del Mar, Christian, Yuri,  
Waskar.**

**A mi jurado, por el tiempo brindado:**

**Dr. Cruz Reyes Vázquez  
Dr. David García Días  
Dr. Ismael Jiménez  
Dr. Waskar Ejjido V  
Dr. Marco González**



FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACION

Subdivisión de Maestrías y Doctorados

Of. No. 325/EJG/HEMR/VIII/97.

**DR. ENRIQUE PIÑA GARZA**  
Director General de Estudios  
de Posgrado, U.N.A.M.  
Presente

Informo a usted que el (la) C. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ  
aspirante al grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS (FISIOLOGIA)  
con la tesis titulada "MODULACION DE LAS CORRIENTES DE CALCIO POR EL  
INTERFERON-ALFA EN REBANADAS Y CELULAS CULTIVADAS DE LA REGION DEL  
HIPOCAMPO DE RATA".

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

PRESIDENTE:	DR. ISMAEL JIMENEZ
SECRETARIO:	DR. DAVID GARCIA DIAZ
PRIMER VOCAL:	DR. CRUZ REYES VAZQUEZ (TUTOR)
SEGUNDO VOCAL	
TERCER VOCAL	
SUPLENTE:	DR. WASKAR EGIDO VILLARREAL
SUPLENTE	DR. MARCO GONZALEZ MARTINEZ

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

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, D.F., a 20 de agosto de 1997

Vo. Bo.

Vo. Bo.

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

DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA.  
Director de la Facultad  
de Medicina

## INDICE.

Resumen.....	3
Abstract.....	5
Generalidades .....	7
Citokinas .....	7
Citokinas y Sistema Nervioso Central.....	10
El Sistema Interferon.....	15
Receptores a los Interferones tipo I.....	16
Receptores a los Interferones tipo II.....	17
Mecanismo de Acción Inmunológico.....	17
Efectos Biológicos de los Interferones.....	19
Planteamiento del Problema.....	25
Objetivos.....	27
Hipótesis.....	27
Metodología.....	28
Registros Extracelulares en Rebanadas de Hipocampo.....	28
Cultivo Celular.....	33
Registro de Corrientes de Calcio.....	35
Resultados.....	38
Registros Extracelulares en Rebanadas de Hipocampo.....	38
Cultivo Celular.....	45
Registro de Corrientes de Calcio.....	47
Discusión.....	63
Conclusiones.....	74
Referencias.....	75

## **RESUMEN.**

Debido a sus efectos antiproliferativos, antivirales e inmunomoduladores, el interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) se emplea en el tratamiento de cáncer, infecciones virales y enfermedades inmunológicas. Sin embargo, su utilidad clínica esta limitada por los efectos colaterales a nivel neural que provoca, entre los que destacan: anorexia, hipertermia, adinamia, parestesias, disminución de la libido, amnesia y cambios conductuales significativos, los cuales son indicativos de una acción directa sobre estructuras cerebrales. La aplicación sistémica y local de IFN- $\alpha$  induce cambios en la frecuencia de descarga de varias estructuras cerebrales, principalmente el hipotálamo y el hipocampo, desconociéndose el mecanismo y los procesos de señalización intracelular que median tales acciones. El presente estudio tiene por objetivo caracterizar la respuesta extracelular de las células hipocampales a la administración de IFN- $\alpha$  y describir el efecto que esta citokina ejerce sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$ . La descripción de las acciones extracelulares del IFN- $\alpha$  se realizó en rebanadas longitudinales de hipocampo de rata colocadas en una cámara de flujo constante (Ringer-Krebs-Henseleit, 1.5ml/min) a 35 °C y con aireación constante (95%  $O_2$  y 5%  $CO_2$ ).

Los registros se realizaron empleando métodos y equipo convencionales. Se administraron cinco diferentes concentraciones de IFN- $\alpha$  (375, 750, 1500, 3000 y 6000 UI) sobre la zona de registro y sus efectos fueron capturados durante un periodo de 60 minutos. El análisis de los efectos de la citokina sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$ , se realizó en células de hipocampo cultivadas, provenientes de embriones de rata de 21 días de gestación, con el empleo de la técnica de fijación de voltaje en porciones de membrana (patch-clamp), configuración célula completa. Tanto la técnica de registro, la metodología y demás paradigmas experimentales empleados fueron las convencionales para el análisis de las corrientes de este ion. La administración del IFN- $\alpha$  provocó cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en la frecuencia de descarga hipocampal. El 68.1% de 51 células registradas, modificaron su actividad eléctrica. La aplicación de las concentraciones menores a 1500 UI provocaron un incremento de la frecuencia de descarga, mientras que el efecto opuesto se observó con la aplicación de concentraciones mayores. El efecto de esta sustancia se manifestó durante al menos 45 minutos después de retirarla del medio. Aunque la intensidad y la duración de los efectos de esta citokina en cada célula, fueron dependientes de la concentración empleada, el número de células afectadas no siguió tal dependencia. No se observaron cambios en el tipo, morfología o tamaño de las espigas registradas después de la aplicación de la citokina.

En los registros de fijación de voltaje en porciones de membrana, la aplicación de pulsos que llevaron el potencial de membrana desde un valor de voltaje de  $-80\text{mV}$  hasta  $+50\text{mV}$ , generó corrientes cuyo tamaño dependió de la edad del cultivo. Las corrientes de mayor amplitud (rango de  $200$  a  $750\text{ pA}$ ), se registraron en células de  $7$  días de cultivo. Al calcular la capacitancia específica de membrana ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), no se observaron cambios significativos ( $p=0.95$ ) entre células con edad de cultivo de  $3$  y  $6$  días. La adición de diferentes concentraciones de  $\text{IFN-}\alpha$  a estas células redujo hasta en un  $67.6\%$  las corrientes entrantes totales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este efecto, el cual fue dependiente de la dosis, se manifestó tanto en protocolos utilizados para analizar la relación corriente-voltaje (I-V), como en protocolos empleados para describir el curso temporal. La curva I-V mostró un desplazamiento del valor máximo de corriente, de  $0\text{mV}$  en condiciones control a  $+10\text{mV}$  en presencia del  $\text{IFN-}\alpha$ ; también, en la curva se observa claramente cómo la corriente de calcio empieza a activarse a valores más negativos en presencia de la citokina. El análisis de las corrientes promedio tanto en ausencia como en presencia del  $\text{IFN-}\alpha$ , mostraron que la citokina es capaz no sólo de disminuir la amplitud de la corriente, sino que además el valor en el que se presenta la corriente máxima se desplaza a valores más positivos. La citokina también modificó el proceso de inactivación lenta del canal, haciendo el valor de la constante de tiempo menor con respecto al control, sugiriendo un bloqueo sobre canales de calcio tipo L.

Estos efectos fueron específicos ya que no se presentaron en registros de células provenientes del ganglio cervical superior de rata. Una característica general de estos efectos fue la incompleta reversibilidad observada. Una vez reducida la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  por la aplicación de la citokina, la eliminación de ésta del medio, sólo provocó una recuperación parcial de la misma, indicando que el  $\text{IFN-}\alpha$  modula la proteína canal de manera diferente a como lo hacen bloqueadores específicos. Estos resultados muestran que el hipocampo de rata es sensible a los efectos de esta citokina, y que los cambios en la excitabilidad provocada por el  $\text{IFN-}\alpha$ , pueden ser consecuencia de un bloqueo de las corrientes entrantes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo con estos experimentos no es posible dilucidar el posible mecanismo intracelular inductor de esta depresión.

## **ABSTRACT.**

Because of its antiproliferative, antiviral and immunomodulating actions, IFN- $\alpha$  has been clinically used to treat cancer, viral infections and immunological disorders. However, most of the treated patients experienced several side effects related with some neurotoxic actions. Thus, anorexia, hyperthermia, paresthesia, adynamia, and reduced gonadal function, also significative conductual changes and memory loss effects had been described after IFN- $\alpha$  treatment. These effects are indicative of a direct action on some specific neural structures. Systemic and local application of IFN- $\alpha$  modifies the excitability of several cerebral nuclei, mainly the hypothalamus and the hippocampus. However, the mechanism of action and the intracellular signaling system used by this cytokine to produce such effects are unknown. The present study characterizes the extracellular response induced by different concentrations of this IFN in hippocampal cells and describes the action of this cytokine on the transmembranal fluxes of calcium, detected through voltage-dependent  $Ca^{2+}$  currents. IFN- $\alpha$  effects on the electrical extracellular activity were recorded in hippocampal longitudinal slices from adult Wistar rats. Slices were immersed in a recording chamber perfused continuously (Ringer-Krebs-Henseleit, 1.5 ml/min) saturated with a gas mixture (95%  $O_2$  and 5%  $CO_2$ ). Conventional equipment and methods were used, to record the extracellular activity of CA1 hippocampal cells, after the application of five IFN- $\alpha$  concentrations (375, 750, 1500, 3000 y 6000 IU).  $Ca^{2+}$  currents recordings were made using the whole cell Patch-Clamp approach, in hippocampal cultured cells from embryonic animals of 21 gestation days. Conventional equipment and methods were used to realize such procedure. All whole-cell recordings were done from pyramidal cells. IFN- $\alpha$  exerts significative effects on the extracellular activity. On average the 68.1% of the 51 recorded cells were affected by the cytokine.

Lower concentrations elicited mainly increases of the electrical activity whereas the higher concentrations provoked decreases of such activity. These effects lasted at least 45 min after the IFN- $\alpha$  was removed. Although both, the intensity and duration were concentration-dependent, the number of affected cells was not. There were not changes on the shape, size or discharge pattern induced by the application of the cytokine.

Whole cell recordings showed that the application of pulses with increasing voltage steps induced inward  $Ca^{2+}$  currents whose amplitudes were dependent on the culture time.  $Ca^{2+}$

currents between 200 and 750 pA were recorded in cells of 7 culture days. Application of IFN- $\alpha$  reduced total Ca<sup>2+</sup> currents 67.6% in a concentration-effect fashion. This effect was observed in either, current-voltage and temporal course protocols. The current-voltage relationship showed a shift of +10mV in the presence of IFN- $\alpha$ , also the current began to activate potentials at more negative. The analysis of mean current either without or with IFN- $\alpha$ , showed that cytokine can reduce the extent of current and displace it to values more positive. Speed of inactivation increased under IFN- $\alpha$  suggesting that principally L-type Ca<sup>2+</sup> channels were affected.

These effects were specific since they were not observed in recordings made in superior cervical ganglion cells. Furthermore effects on hippocampal cells were not completely reversible, suggesting that cytokine modified the protein channel in a form different from the others block. These results indicate that the rat hippocampus is a target organ for IFN- $\alpha$  actions and that the excitability changes induced by the cytokine could result from modification of Ca<sup>2+</sup> fluxes through the cell membrane. The intracellular signaling mechanisms involved in the depressing action on Ca<sup>2+</sup> current, remain to be elucidated.

## **GENERALIDADES.**

### **CITOKINAS.**

Las citokinas constituyen un grupo amplio y variado de proteínas, las cuales actúan como moduladores químicos de muchas respuestas celulares. Estas sustancias son sintetizadas en respuesta a diferentes estímulos para actuar sobre órganos y/o células blanco modificando su actividad. Algunas citokinas son producidas en respuesta a una amplia gama de inductores y por diferentes tipos de células, mientras que otras sólo son sintetizadas por un sólo tipo celular en respuesta a un estímulo específico <sup>89</sup>.

Las citokinas se describieron inicialmente por sus efectos a nivel inmunológico, principalmente por su acción activadora del sistema inmune (SI) y por su participación en la respuesta inflamatoria; así como por su origen, ya que principalmente son sintetizadas por células inmunes, como los macrófagos, monocitos, linfocitos T y B, y células asesinas naturales (natural killer, NK). En el sistema inmune (SI) estas citokinas inducen acciones proliferativas, síntesis de anticuerpos y eliminación de bacterias y tumores <sup>3,89</sup>. Recientemente se demostró que además estas proteínas son sintetizadas y liberadas por casi todas las células de la economía y por lo tanto participan también en la regulación de acciones celulares diferentes a las inmunes.

Estas moléculas afectan a su órgano blanco mediante tres procesos semejantes a los utilizados por otras sustancias: uno de estos es el **autocrino**, en el cual, la citokina sintetizada es capaz de actuar sobre receptores localizados en la misma célula que las liberó, regulando su propia producción. El segundo, es el **paracrino**, donde la citokina liberada actúa sobre células blanco adyacentes a la célula que la produjo. Finalmente el proceso **endocrino**, consiste en que la citokina es capaz de convertirse en un mensajero químico y viajar a través de la circulación, para modificar diversos procesos celulares sobre células blanco localizadas en órganos o sistemas lejanos <sup>89</sup>.

El término citokina se aplica a varios grupos de proteínas diferentes las cuales están clasificadas con base en aspectos históricos más que funcionales, por lo que citokinas del mismo grupo o familia son capaces de ejercer efectos incluso antagónicos.

Los grupos más estudiados de citokinas son:

- a) Factores de crecimiento que incluyen al factor de crecimiento epidermal (EGF); factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF  $\alpha$  y  $\beta$ ), y el factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF).
- b) Las Interleucinas que comprenden desde la interleucina 1 a la 11 (IL-1 a IL-11).
- c) Factores estimulantes de colonias, como el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF); factor estimulante de colonias monocíticas (M-CSF); factor estimulante de colonias granulocíticas-monocíticas (GM-CSF).
- d) Factores de crecimiento transformante alfa y beta (TGF  $\alpha$  y  $\beta$ ).
- e) Factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF $\alpha$  y  $\beta$ ).
- f) Neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor de crecimiento neuronal (NGF); neurotrofinas 3 y 4 (NT-3 y NT-4).
- g) Neuropoyetinas como el factor inhibidor de leucemia (LIF); factor neurotrófico ciliar (CNTF).
- h) Interferones que incluyen el alfa, beta, gamma, tau y omega (IFN-  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\tau$  y  $\omega$ ).

Cada citokina tiene efectos variados y actúan a través de mecanismos independientes. La diferencia fundamental reside en el tipo de receptor al cual se unen para llevar a cabo sus efectos **42,89**.

Las concentraciones de las citokinas son mínimas en condiciones fisiológicas, sin embargo éstas se elevan en situaciones especiales como la embriogénesis o durante los traumas, algunas enfermedades o incluso durante el estrés agudo. Lo anterior sugiere que estas moléculas participan en la regulación de los procesos que mantienen un equilibrio funcional. Durante estas situaciones las citokinas, estimulan los procesos de reparación tisular, mientras que durante la embriogénesis inducen el crecimiento rápido **89**.

La acción promotora de las citokinas en la diferenciación y crecimiento celular, sugiere en su conjunto también una acción inhibidora citotóxica o citostática. Las citokinas son capaces de activar dos clases diferentes de genes: los proto-oncogenes, que ejercen un efecto positivo sobre la proliferación celular, y los genes supresores de tumores o anti-oncogenes, los cuales previenen la proliferación celular. Entre los proto-oncogenes que responden a factores de crecimiento están el ERB, FMS, KIT, y otros proto-oncogenes como FOS, MYC y JUN que se unen al DNA y actúan como reguladores transcripcionales<sup>89</sup>. Adicionalmente, la contribución de las citokinas en la respuesta a un antígeno es de suma importancia, por ejemplo, la activación de los linfocitos T en la respuesta inmune esta mediada por citokinas, principalmente interleucinas<sup>3</sup>.

Estructuralmente las citokinas son proteínas o glicoproteínas, y por lo tanto no atraviezan libremente la membrana celular, por lo que únicamente ejercen su acción a través de su unión con una proteína receptora localizada en la membrana. Una vez unidas a su receptor, algunas citokinas se internalizan<sup>42,89</sup>. Los sitios de unión para las citokinas, hasta ahora descritos, tienen una estructura similar independientemente de la citokina a la cual se unan. Estos, están conformados por una o más cadenas polipeptídicas transmembranales, con un dominio extracelular generalmente glicosilado, que funge como el sitio de unión con la citokina, un dominio transmembranal mediante el cual se fija a la membrana celular y un dominio intracelular responsable de la transducción de señales dentro de la célula<sup>42,82</sup>. La cantidad y funcionalidad de los receptores a las citokinas sobre la superficie de la membrana celular depende fundamentalmente del recambio y el reciclaje de receptores previamente internalizados<sup>29,89</sup>.

Cuando las citokinas se unen a su receptor específico en la membrana promueven la transcripción genética así como diversas respuestas asociadas con el ciclo y diferenciación celular, estos efectos están mediados por la fosforilación reversible de proteínas<sup>42</sup>, como las cinasas, encargadas de fosforilar otras proteínas en residuos específicos de aminoácidos. La mayoría de las cinasas fosforilan treonina y serina, pero existe además, un tipo que fosforila específicamente residuos de tirosina. La fosforilación de este aminoácido es importante en los procesos de regulación del ciclo celular, que efectúan algunas citokinas como factores de crecimiento, interleucinas e interferones<sup>41, 42, 82</sup>.

Las cinasas que fosforilan tirosina se localizan en la porción citoplasmática del receptor y son referidas como JANUS cinasas en semejanza al dios romano Janus (el cuál tenía dos caras), ya que estas proteínas poseen dos sitios potencialmente capaces de adicionar grupos fosfato a otras proteínas<sup>41</sup>. Inicialmente se describieron dos enzimas de esta familia, la Jak-1 y la Jak-2 y más recientemente (1993), en cultivos de neuronas de hipocampo y en células de cáncer de mama, la Jak-3 <sup>42,82</sup>. El mecanismo crítico para desencadenar los efectos de las citokinas es la fosforilación de residuos de tirosina, de proteínas intracelulares que participan en la transducción y transcripción genética.

#### CITOKINAS Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Durante muchos años se consideró al sistema nervioso central (SNC), como un órgano inmunológicamente aislado debido principalmente a la presencia de la barrera hematoencefálica. Esta se pensaba, era capaz de impedir toda influencia que el SI pudiera ejercer sobre las diversas regiones cerebrales. Sin embargo, se describió una relación funcional importante para el organismo entre el SNC y el SI. Tal comunicación se establece por la síntesis y liberación de sustancias. Así, el SNC libera moléculas reguladoras conocidas como neurotransmisores, mientras que el SI sintetiza factores solubles, llamados citokinas.

A nivel fisiológico, al liberarse las citokinas, éstas alcanzan al SNC y activan células neuronales que liberan sustancias neurotransmisoras para estimular a otros grupos celulares, entre ellos a las células del SI para que, a su vez, incrementen la síntesis de citokinas. Estos inmunoreguladores actúan nuevamente sobre células del SNC con lo cual se establece un mecanismo de retroalimentación entre los dos sistemas y con ello se mantiene un equilibrio con el resto del organismo y el medio ambiente. Existe además otra vía en la comunicación neuro-inmune, la cual se establece por la invasión directa de órganos del SI como el bazo, timo y médula ósea (Fig. 1) <sup>28</sup>. Estas conexiones parecen jugar un papel importante en la coordinación de respuestas conductuales y fisiológicas durante procesos de infección e inflamación.

La presencia de estas citokinas dentro del espacio intercelular del SNC, se debe a varios mecanismos. Por ejemplo, en estados patológicos que se acompañan de inflamación, las células productoras de citokinas pueden infiltrarse a través de un proceso de diapedesis dentro del fluido

cerebral. Este proceso inflamatorio, también puede ser inducido y mantenido por las mismas citokinas. El  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ ; inducen un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, con un consecuente aumento de leucocitos dentro del líquido cefalorraquídeo, y la producción de edema cerebral <sup>86</sup>.

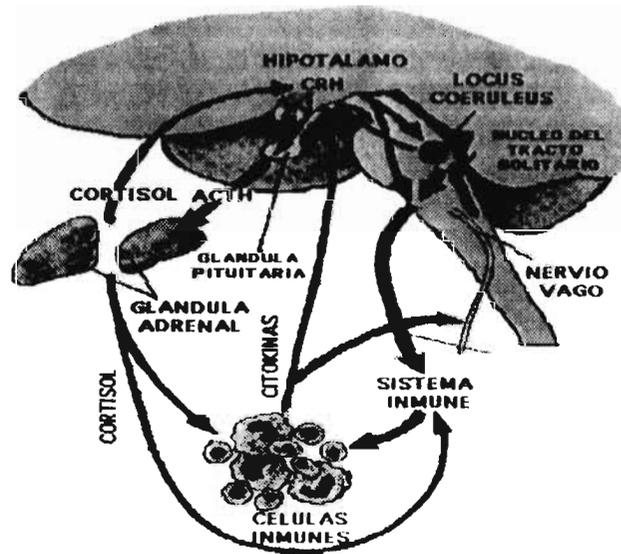


FIG. 1. Representación esquemática del circuito existente entre el sistema nervioso central y el sistema inmune. Esta conexión se realiza gracias a los sistemas neuroendocrinos y a la presencia de citocinas.

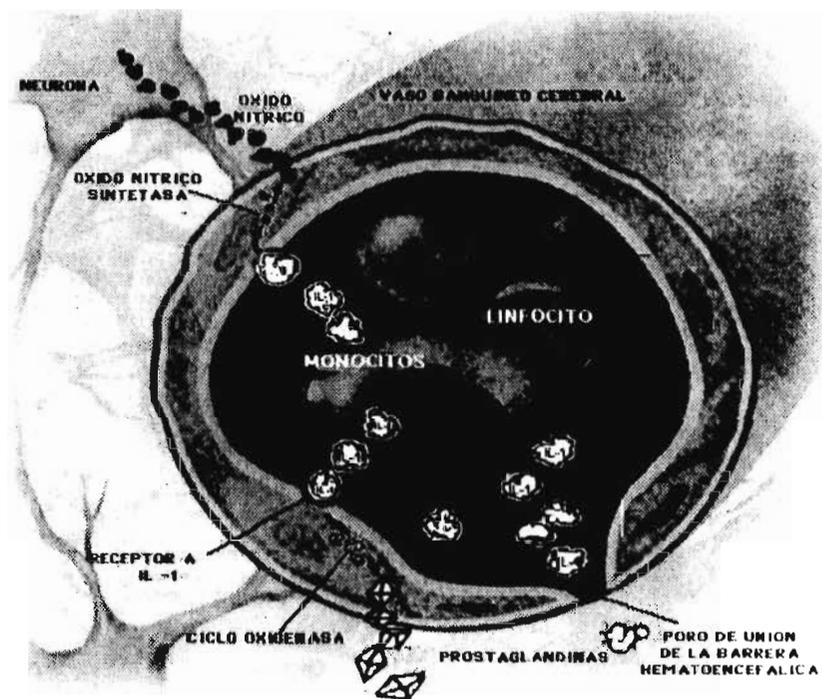


FIG. 2.- Mecanismos por los cuales las diferentes citocinas pueden alcanzar el SNC, incluyen su transporte sanguíneo, la extravasación de células productoras de las mismas y su síntesis por elementos neurales.

Las citocinas también, son sintetizadas y liberadas por las células gliales, como astrocitos, oligodendrocitos, células ependimales y microglía. Así, los astrocitos cultivados de ratón, secretan concentraciones elevadas de un factor semejante a la IL-1 en respuesta a lipopolisacáridos <sup>6,54</sup>. Recientemente se mostró que algunas neuronas, también pueden expresar citocinas; sobre todo del tipo de la IL-1, 6 y TNF- $\alpha$  en regiones cerebrales como el hipotálamo, hipocampo, y corteza cerebral (Fig 2) <sup>89</sup>.

La síntesis de citocinas dentro del cerebro depende de la naturaleza del estímulo inductor, que influye sobre la expresión de estas proteínas en el hipotálamo <sup>96</sup>. Los cultivos de astrocitos expresan de manera constitutiva IL-3, IL-4, IL-6, ILF y M-CSF, cuya concentración se incrementa con la presencia de inductores, lo que sugiere la participación de estas citocinas en la génesis y desarrollo de enfermedades degenerativas cerebrales. Es posible también, que las citocinas se introduzcan al SNC mediante un mecanismo de acarreo por transportadores proteicos localizado en las células endoteliales de los capilares cerebrales <sup>70</sup>.

Las citocinas son indispensables para modular algunos procesos inflamatorios cerebrales; por ejemplo, la IL-6 induce la síntesis de glucocorticoides, la hematopoyesis y la fase aguda de la respuesta inflamatoria <sup>39,40</sup>. Algunas citocinas juegan un papel importante en procesos de diferenciación neuronal, entre ellas se encuentran el factor inhibidor de leucemia, el factor activador promotor del crecimiento y el factor neurotrófico ciliar. Estas citocinas poseen homología entre sí y regulan el mismo conjunto de genes cuya transcripción da origen a neuropéptidos y neurotransmisores en neuronas simpáticas.

En este sentido, el CNTF estimula la supervivencia de neuronas ciliares en cultivo. Esta citocina se expresa predominantemente en células gliales del sistema nervioso periférico (SNP) y SNC <sup>90</sup>. La comunicación retrograda y anterograda mediante mecanismos transinápticos permiten el intercambio de factores químicos formando una red de circuitos que mantienen el buen funcionamiento del SNC <sup>29</sup>.

Las citocinas influyen sobre varios sistemas neuroendocrinos, principalmente sobre el eje hipotálamo-pituitaria-adrenales, como resultado de una acción estimuladora de la liberación de la hormona adrenocorticotrófica y glucocorticoides. La IL-1 es uno de los más potentes activadores de esta vía, aunque otras citocinas como IL-2, IL-6 y TNF- $\alpha$  son sinérgicas y afectan por lo tanto las respuestas neuroendocrinas. Las citocinas IL-6, IL-1, EGF y TGF- $\alpha$  también estimulan la liberación del factor liberador de gonadotropinas (LHRH) <sup>7</sup>. Así, su administración crónica dentro

del cerebro interrumpe el ciclo estral al modificar la ciclicidad en la síntesis y liberación de LHRI e inhibir la luteolisis por el incremento en la liberación de prolactina <sup>79,81</sup> Los glucocorticoides también modulan la respuesta de las citokinas en el organismo. Por ejemplo, incrementan los niveles de RNAm para la codificación de NGF en células de hipocampo tanto *in vivo* como en cultivos <sup>52</sup> Por su parte, la dexametasona afecta diferencialmente la expresión de NGF en neuronas cultivadas y astrocitos de hipocampo.

Las citokinas actúan sobre procesos sinápticos que involucran fenómenos de plasticidad. Estas proteínas son transportadas por un flujo axoplásmico anterogrado para modular la liberación sináptica inducida por la despolarización. Por ejemplo la estimulación tetánica de la neocorteza intacta libera citokinas, las cuales aplicadas a cultivos de células PC12 mejoran su crecimiento neurítico, y en rebanadas de hipocampo inducen potenciación a largo plazo (PLP) <sup>85</sup> En esta preparación, el factor de crecimiento epidermal y el factor de crecimiento de fibroblastos incrementan la potenciación a largo plazo y la pendiente de subida del potencial postsináptico excitador en la región CA1 después de la estimulación tetánica, pero no disminuye su frecuencia de descarga. A pesar de ejercer efectos similares, las acciones de estas dos citokinas son diferentes, ya que el incremento de PLP por el factor de crecimiento epidermal ocurre principalmente en las fases tempranas de la estimulación, mientras que el efecto del factor de crecimiento de fibroblastos es más significativo en las últimas etapas <sup>1</sup>

Algunas citokinas afectan la plasticidad sináptica en forma negativa, así en preparaciones de rebanadas de cerebro de regiones de hipocampo y neocorteza: la IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\alpha$  todas inhiben la PLP, aunque emplean mecanismos no comunes que varían dependiendo de la citokina. Por ejemplo, la IL-1 incrementa el efecto de GABA al mejorar la conductancia al Cl<sup>-</sup> e inhibe las corrientes de Ca<sup>2+</sup> <sup>1,6,7</sup>

Las citokinas también son sintetizadas dentro del cerebro durante ciertos procesos patológicos, los cuales involucran alteraciones y muerte celular, lo que sugiere que estas sustancias están involucradas en procesos de neurodegeneración y reparación cerebral. Estos procesos dependen de interacciones entre neurotransmisores y neuropéptidos. Las lesiones cerebrales se acompañan de fiebre, alteraciones de la función neuroendocrina y vegetativa, incremento en el metabolismo y cambios conductuales, como anorexia, somnolencia, actividad exploradora y sexual disminuida e inmunestimulación <sup>80,89</sup> El sistema circulatorio es empleado

por citokinas como la IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , como medio de transporte para mantener altas concentraciones cerebrales y empleando mecanismos endocrinos que controlan múltiples mecanismos fisiológicos a nivel del SNC <sup>80,89,95</sup>. Así, por ejemplo la IL-6 es considerada como un pirógeno endógeno circulante y mediador de la respuesta de fase aguda <sup>61,63,64</sup>. Durante esta respuesta se presenta un incremento en la síntesis de prostaglandinas, la cual es adicionalmente estimulada por IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y PDGF. Estas sustancias provocan un incremento en la concentración y actividad de enzimas como la ciclooxigenasa y fosfolipasa A<sub>2</sub> <sup>81</sup>. La administración central o periférica de citokinas simula las respuestas cerebrales a los diversos procesos patológicos. Además, las citokinas están involucradas en procesos de modulación de la permeabilidad a determinados iones en células neuronales <sup>66,70,80,81</sup>.

#### **EL SISTEMA INTERFERON.**

Una de las citokinas más ampliamente estudiada es el IFN, esta proteína fue descrita por primera vez en 1957, por Isaacs y Lindenmann <sup>36</sup> quienes observaron que cuando un virus infecta células animales, éstas producen una sustancia que interfiere con la replicación viral en otras células. Isaacs y Lindenmann denominaron a esta sustancia interferon. Tras su producción y liberación por parte de células infectadas, el IFN difunde a las células vecinas no infectadas y se une a receptores de superficie, lo que induce síntesis de proteínas antivíricas las cuales interfieren o inhiben la replicación viral.

El IFN es una importante defensa contra las infecciones virales ya que los virus provocan enfermedades sólo cuando se replican en el interior de las células del organismo. Aunque originalmente, esta citokina fue considerada como un agente antiviral, también ejerce importantes funciones que no se relacionan con tales procesos. Entre ellas se encuentra su acción moduladora sobre la diferenciación de algunas células y sus efectos citostáticos <sup>29,37,89,92</sup>.

El término IFN, en realidad agrupa todo un conjunto de familias de glucoproteínas, las cuales de acuerdo a su estructura, tipo de células que las producen y al estímulo que induce su síntesis, inicialmente se clasificaron en  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\tau$  y  $\omega$  <sup>32</sup>. Posteriormente con base en la estructura y al tipo de receptor al que se unen, se agruparon bajo el término de interferones tipo I, que incluye al  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$  y  $\tau$ , mientras que únicamente, el IFN- $\gamma$  constituye el grupo de IFN tipo II (Cuadro 1).

El IFN- $\gamma$ , también conocido como inmunológico, estimula la actividad citolítica de las células fagocitarias y de las células NK; en cambio los interferones tipo I ejercen efectos antiproliferativos. Ambos tipos de interferones son producidos por diferentes células del organismo, principalmente las células del sistema inmune <sup>41</sup>.

**CUADRO I. Clasificación de los diversos tipos de interferon con base en su estructura, las células que los producen, sus inductores y sus efectos principales.**

TIPOS DE INTERFERON	IFN-TIPO I				IFN-TIPO II
	$\alpha$	$\beta$	$\omega$	$\tau$	$\gamma$
ESTRUCTURA	UNA SOLA CADENA DE AMINOACIDOS				DIMERO DE CADENAS IDENTICAS DE AMINOACIDOS
PRINCIPALES CELULAS PRODUCTORAS	FIBROBLASTOS Y CELULAS INFECTADAS POR VIRUS				LINFOCITOS T Y CELULAS NK
PRINCIPALES INDUCTORES	DNA Y RNA VIRAL, ANTIGENOS DE CELULAS PROCARIOTAS				MITOGENOS T, ANTIGENOS T DEPENDIENTES
PRINCIPALES EFECTOS	INDUCEN LA SINTESIS DE PROTEINAS QUE INHIBEN LA PROLIFERACION VIRAL				MODULACION DE LA ACTIVIDAD INMUNE CONTRA TUMORES E INFECCIONES

#### RECEPTORES DE LOS INTERFERONES TIPO I.

Los interferones ejercen sus acciones a través de su unión a receptores específicos en la superficie de las células blanco. Estos receptores se describieron gracias al empleo de técnicas de radiomarcaje por iodización y fosforilación <sup>42</sup>, realizadas principalmente en roedores y humanos. Los resultados de estos estudios muestran que esta unión es dependiente de variables como el tiempo de exposición, temperatura y concentración del IFN <sup>69</sup>. La unión de los interferones a sus receptores es saturable, y su concentración varía de acuerdo al tipo celular; por ejemplo existen aproximadamente de  $2 \times 10^2$  a  $6 \times 10^3$  receptores por célula linfocitaria cultivada. La unión del IFN- $\alpha$  a su receptor se caracteriza por mostrar una constante de disociación en el rango de  $1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-11}$  M <sup>13</sup>.

Una vez realizada la unión, el complejo IFN- $\alpha$ -receptor es rápidamente internalizado vía endocitosis. Al igual que ocurre con otros receptores a péptidos, los receptores al IFN manifiestan un proceso de regulación de su sensibilidad basado a la concentración de ligando, es decir, se

produce una modificación en la actividad y número de receptores en la superficie celular cuando se realiza su incubación con un exceso o una disminución del ligando específico. Fenómenos conocidos como regulación "Down" y "Up" <sup>14,98</sup>. El gen que codifica para el receptor tipo I en humanos se encuentra localizado en el cromosoma 21 y los de ratón en el cromosoma 16.

#### **RECEPTOR PARA IFN TIPO II.**

El receptor al IFN tipo II se localiza en gran variedad de células humanas y de ratón. En general las células tienen  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^4$  receptores por célula y muestran una constante de disociación en el rango de  $1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-11}$  M. Al igual que en el caso del IFN- $\alpha$ , sus efectos celulares se manifiestan aún cuando la ocupación de los receptores es baja. El receptor al IFN-tipo II se encuentra codificado por un gen localizado en el cromosoma 6 humano <sup>68,69</sup>.

#### **MECANISMO DE ACCION INMUNOLOGICO.**

Las citocinas ejercen sus acciones a través de la activación de proteínas cinasas. El ejemplo clásico de señalización de citocinas lo constituye el IFN. Después de la unión del IFN a un receptor y de la activación de la cinasa Janus (Janus Kinasa, JaKs), es necesaria la unión correcta de las cadenas de proteínas JaKs a la porción citoplasmática del receptor al IFN.

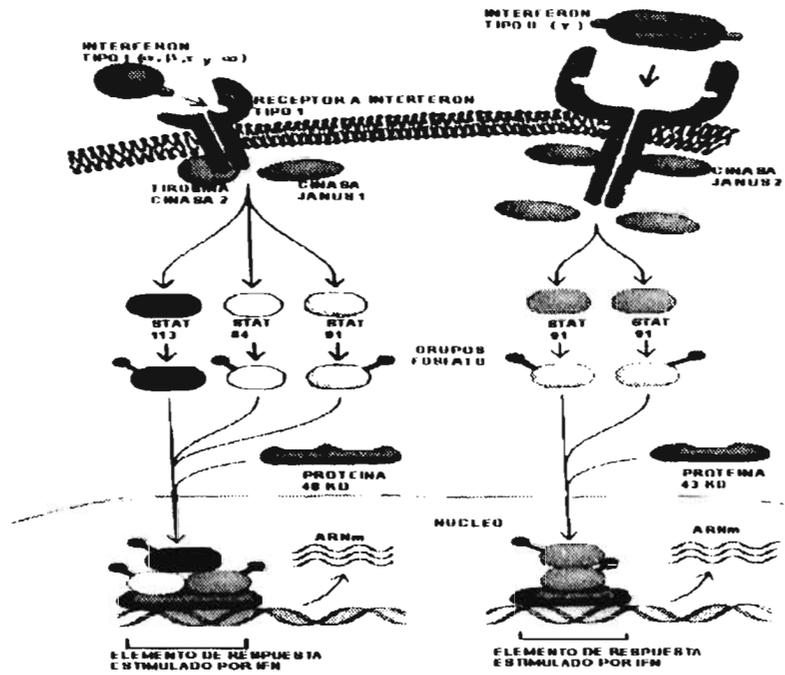


FIG.3.- Las acciones inmunológicas provocadas por el IFN son mediadas a través de receptores específicos de especie localizados en la membrana celular. Dentro de los mecanismos intracelulares implicados participan cinasas de la tirosina y un conjunto de proteínas que modulan la expresión genómica. Los mecanismos son muy similares para ambos tipos de interferones.

STAT: transductoras de la señal y activadoras de la transcripción.

En el caso del receptor al IFN- $\gamma$  su cadena alfa debe asociarse a la JaK 1, para que una vez que se da la unión ligando-receptor, se una a la JaK 2, y se inicien los eventos de activación de la señal. En el caso del receptor al IFN tipo I, es la cadena beta del receptor la que se une a JaK 1, mientras que la cadena alfa lo hace a la Tirosina Kinasa 2 (TyK2) <sup>42,82</sup>. La porción final del mecanismo de señalización intracelular consiste en la transcripción o copia de genes, para dar lugar a un ácido ribonucleico mensajero (ARNm) lo que permite la síntesis de proteínas que ejerceran diferentes efectos biológicos (Fig. 3).

Al unirse los IFN-I a su receptor activan tanto a la enzima kinasa de la tirosina 2 (TyK2) como a la JaK 1, las cuales están unidas al dominio intracelular del receptor. Estas cinasas una vez activas, fosforilan tres proteínas STAT (transductoras de la señal y activadoras de la transcripción) de 113, 91 y 84 KD, las cuales se asocian a una proteína complementaria de 48 KD. Este complejo se internaliza en el núcleo y se une a ciertos genes, dirigiendo así la maquinaria de transcripción celular hacia la formación de ARNm y por lo tanto de la síntesis proteica. Los interferones que pertenecen al grupo I son capaces de reconocer receptores similares, o incluso competir por el mismo <sup>41,42</sup>.

La estimulación de la transcripción genética por el IFN tipo II involucra, la activación de Jak 1 y Jak 2 las cuales están unidas de manera estructural al receptor. Una vez activadas fosforilan a dos proteínas STAT de 91 KD y una proteína complementaria de 43 KD, generando el complejo proteico, el cual se une a los genes en el núcleo, para iniciar la transcripción del ARNm <sup>41,42</sup>.

#### **EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS INTERFERONES.**

Inicialmente se sugirió que los efectos tóxicos de los interferones sobre el organismo, eran resultado de que la preparación del IFN aplicado no estaba totalmente pura. Sin embargo, la mayoría de estos efectos continuaron presentándose después de la aplicación de interferones recombinantes y derivados de cultivos, los cuales mostraron grados de pureza de hasta el 99%. Estas preparaciones de interferon tienen actividad antiviral y antiproliferativa, que depende de la fracción purificada y del tipo de IFN empleado <sup>27,32</sup>. Por ejemplo, de toda la familia de interferones tipo I, el IFN- $\alpha$  ejerce un menor efecto sobre la estimulación de la actividad citotóxica de linfocitos y macrófagos, así como de células NK, además, algunas subclases de este IFN no

estimulan la expresión de antígenos asociados a tumores, pero conservan su actividad antiviral y antiproliferativa. Esto indica que las acciones de estas citokinas pueden involucrar diferentes mecanismos, y por lo tanto provocar los diferentes efectos atribuidos a un mismo tipo de IFN.

Los interferones, al igual que otras citokinas, ejercen efectos sobre la modulación de la diferenciación celular <sup>31</sup>, sobre la expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II y estimulan a los receptores tipo Fc (fracción cristalizable) de las inmunoglobulinas mediante un mecanismo endocrino. Los interferones, también, son elementos importante en la regulación de la respuesta inflamatoria, tanto aguda como crónica. Así, su administración provoca un aumento o una inhibición de la inflamación, que depende del tiempo de administración de la citokina, la dosis y la presencia de otras citokinas que estén modulando este proceso <sup>37</sup>.

Dentro de la familia de interferones, el IFN- $\alpha$ , comprende varias subclases de glicoproteínas, las cuales son utilizadas terapéuticamente en algunos padecimientos, debido a sus propiedades para modular el crecimiento y la destrucción celular inducida por mecanismos autoinmunes <sup>92</sup>. Con base en estos efectos, en varios estudios se analiza el potencial terapéutico de esta citokina en padecimientos como cáncer, hepatitis, y esclerosis múltiple, entre otras enfermedades <sup>58</sup>. Estos estudios muestran que su administración en humanos, se acompaña de una gran variedad de efectos tóxicos principalmente sobre el SNC, los cuales desaparecen con la interrupción del tratamiento. Estos efectos inducidos por la citokina incluyen letargia e hipersomnia, desórdenes afectivos y cambios cognitivos como confusión, alteraciones de la memoria y disminución en la abstracción verbal y destreza visiográfica<sup>22</sup>. Otros efectos del IFN- $\alpha$  en humanos son la inducción de anorexia, adinamia, fiebre y una reducción en la síntesis de células sanguíneas por la médula ósea, lo que origina anemia<sup>41,78</sup>. Frecuentemente, los síntomas cerebrales se acompañan de anomalías en el registro electroencefalográfico, que incluye modificaciones en la actividad de onda delta <sup>22, 58</sup>.

El IFN- $\alpha$  recombinante humano, el derivado de leucocitos de rata y de híbridos recombinantes, tienen una acción inhibitoria sobre el eje hipotálamo-pituitaria-adrenocortical, este efecto es antagonizado por la naloxona, lo que sugiere la participación de receptores opioides. Sin embargo, la administración en dosis altas de esta misma citokina induce efectos opuestos, que no son bloqueados por el antagonista opioide, lo que sugiere mecanismos de acción dependientes de la

concentración del IFN  $\alpha$  <sup>63</sup>. Estos efectos se correlacionan con una disminución de la actividad eléctrica de las neuronas hipotalámicas del núcleo paraventricular, sitio de origen de las neuronas secretoras del factor liberador de corticotropina. Tales efectos además, sugieren una interacción importante entre el sistema neuroendocrino y el inmune, la cual sustentaría algunos efectos sobre el crecimiento y la función adrenal que se observan en enfermedades inmunes, tanto agudas como crónicas

Entre las estructuras del SNC que responden a la presencia del IFN- $\alpha$  se encuentra el hipotálamo, estructura coordinadora de las actividades vegetativas, neuroendocrinas y emocionales <sup>6,71,78</sup>. En las regiones lateral, paraventricular y ventromedial del hipotálamo, se encuentran las zonas que controlan la ingesta de alimento, actividad que se reduce por la administración intracerebroventricular (ICV) de IFN- $\alpha$ , y que se acompaña de aumento en la excitabilidad de las neuronas de estas regiones cerebrales <sup>78</sup>. La administración ICV de esta citokina provoca también un aumento en la temperatura rectal y del líquido cefalorraquídeo, con un incremento en el sueño de onda lenta; estos efectos son dependientes de la duración del tratamiento con la citokina y del tipo de IFN- $\alpha$ , que se administre <sup>71,78,81</sup>

Las citokinas modulan los patrones de actividad eléctrica de neuronas en el cerebro, con la consecuente influencia sobre la liberación y el recambio de algunos neurotransmisores, actividades asociadas con la acción de segundos mensajeros, como el AMPc, la proteína cinasa C, el ácido araquidónico y el óxido nítrico, lo cual conlleva a una modulación del influjo de  $Ca^{2+}$  <sup>81</sup>. Dependiendo de la dosis administrada, el IFN- $\alpha$ , modifica parámetros eléctricos del SNC, tales como la frecuencia de descarga y la permeabilidad de algunos iones como el  $Ca^{2+}$ , los cuales sustentan fenómenos de plasticidad cerebral, del tipo de la potenciación de largo plazo y la de corto plazo. Por otra parte, en células hipocámpales cultivadas de embrión de rata, el IFN- $\alpha$ , disminuye la corriente máxima de calcio inducida por N-Metil-D-Aspartato <sup>25</sup>, las cuales provocan cambios plásticos neuronales. Los efectos del IFN- $\alpha$  sobre las permeabilidades y corrientes iónicas sustentan las modificaciones en los patrones de actividad que inducen la mayoría de los efectos neurológicos colaterales observados en los pacientes tratados con esta citokina. Además, estas acciones sobre la excitabilidad neuronal indican que el IFN- $\alpha$ , actúa a nivel de la membrana celular, aunque no se puede señalar un mecanismo de acción <sup>65</sup>

El flujo transmembranal de calcio que ocurre durante la despolarización celular es una de las vías principales que controlan el calcio intracelular en las neuronas. A su vez, las concentraciones de calcio intracelular son primordiales en el desarrollo y manifestación de múltiples activadores celulares. Por ejemplo, procesos modificados por las citokinas, como el desarrollo de los organelos y neuritas, así como el crecimiento y diferenciación celular, son procesos que dependen de la concentración de calcio intracelular y como consecuencia de los mecanismos que a nivel de la membrana modulan la entrada de este ion a la célula <sup>65</sup>. Las acciones del IFN- $\alpha$  pueden explicarse por una interacción con los canales de calcio con lo cual se modificarían las corrientes de este ion.

Algunos resultados experimentales sugieren una interacción entre los canales de calcio y las citokinas, por ejemplo, la depolarización crónica de las neuronas hipocámpales y con ello el incremento en la concentración intracelular de calcio, aumenta de manera importante el tiempo de supervivencia de las neuronas en cultivo, evitando aún en ausencia de los factores tróficos necesarios, la muerte celular programada <sup>20</sup>. Cuando el IFN- $\alpha$  se aplica a estas neuronas, la movilización de calcio hacia el interior, es reducida, pero a diferencia de lo que se observa cuando se utilizan bloqueadores selectivos de canales de calcio, esta inhibición no es reversible en su totalidad <sup>25</sup>.

Estos datos muestran que el hipocampo es una estructura cerebral, altamente sensible a los efectos IFN- $\alpha$ , lo cual reviste particular importancia puesto que esta región cerebral es el centro coordinador de muchas funciones conductuales como el aprendizaje y la memoria, las cuales están sustentadas por fenómenos de plasticidad, en los que a su vez, el ion  $Ca^{2+}$ , participa de manera relevante. En estas neuronas este ion ingresa a la célula a través de la membrana celular por la activación de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) <sup>44</sup>.

Estudios previos mostraron que estos CCDV se encuentran ampliamente distribuidos en todo el hipocampo <sup>44</sup> y participan en procesos típicos de crecimiento, diferenciación, desarrollo, transmisión sináptica y liberación de neurotransmisores, los cuales constituyen mecanismos subyacentes a todas las funciones conductuales. Al igual que en muchas otras estructuras del cerebro, en el hipocampo los canales de calcio se clasifican como HVA (activados a altos voltaje) y los LVA (activados a bajos voltaje). Estos últimos están representados exclusivamente por los canales tipo T, ya que se activan a valores negativos de potencial de membrana (-70 a -60 mV) y

muestran un voltaje de inactivación desde valores positivos hasta -50 mV. Estos canales son sensibles a medios básicos, así como a la presencia de amilorida.

Por su parte, los canales tipo HVA, se subdividen en L, N, y P. De estos, los canales tipo L, muestran un voltaje de activación elevado, con valores desde -10 a positivos y son inactivados a -40 mV. Estos canales se caracterizan por su alta sensibilidad a las dihidropiridinas, del tipo de la nitrendipina, el verapamil y la nifedipina <sup>44</sup>. Por otro lado, los canales tipo N, se activan con pulsos de valores desde -40 a -30 mV y son bloqueados por  $\omega$ -conotoxina <sup>44,53</sup>. En lo que se refiere a canales de calcio tipo P, estos se caracterizan por poseer tres distintos niveles de conductancia para un solo canal, con valores de 9 a 10, 13 a 14 y 18 a 19 pS, muestran poca inactivación y su activación dependiente del voltaje, esta en valores intermedios entre los valores de voltaje de activación de los canales tipo N y T. Este canal es bloqueado por poliaminas purificadas como las toxinas de algunos arácnidos <sup>44</sup>.

La distribución de estos canales en el hipocampo es heterogénea; por ejemplo, los canales tipo T se encuentran localizados principalmente en neuronas piramidales de la región CA3, no excluyendo dentro de esta misma zona, la considerable presencia de los canales tipo N y L. Por otro lado, el canal tipo L se encuentra distribuido en las células piramidales de las regiones, CA1 y la CA3. En las células granulares, el porcentaje de estos canales es menor al 10 %. En lo que respecta al canal de calcio tipo N, existe una amplia distribución en las tres zonas analizadas, cuyo porcentaje rebasa el 70% <sup>44</sup>. Estudios relacionados con los canales tipo P, muestran que la presencia de sustancias del tipo de las poliaminas, reducen la transmisión sináptica en las regiones CA3, CA1 y en células musgosas hipocámpales, lo que sugiere la presencia de canales tipo P en el hipocampo, con una localización en las terminales presinápticas <sup>44</sup>.

La clasificación anterior se basa principalmente en las características cinéticas y farmacológicas de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Cada uno de estos canales de calcio es una proteína heteropentamérica transmembranal que consiste de una subunidad  $\alpha_1$ , una  $\alpha_2$ , una  $\alpha_3$  y una  $\beta$ . También se ha encontrado que una subunidad  $\gamma$  forma parte del canal, pero no en todos los tipos <sup>57</sup>. De estas subunidades la  $\alpha_1$  determina la afinidad de unión al antagonista y la función básica de cada canal. Lo que indica que las propiedades farmacológicas entre los diferentes tipos de canales, es debida a que cada uno de ellos tiene subunidades  $\alpha_1$  distintas, en este sentido se clonaron cuatro genes que codifican para estas subunidades en los canales HVA. Estas diferencias moleculares dan lugar a una nueva clasificación, así el RNAm que codifica para la subunidad  $\alpha_1$  A

da lugar a canales tipo P o Q, . el de la subunidad  $\alpha 1 C$  forma parte del canal tipo L, y el ARNm para la subunidad  $\alpha 1 B$  codifica para el canal de calcio tipo N <sup>57,94</sup>.



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La administración de IFN- $\alpha$  en animales integros induce efectos en varias esferas no relacionadas, necesariamente, con un aspecto inmunológico. En el caso del sistema nervioso central, los efectos provocados por esta citokina se manifiestan practicamente en todos los procesos neurales descritos; esto es, desde fenómenos de embriogénesis, desarrollo, diferenciación y muerte celular, hasta los mecanismos conductuales más complejos, como los procesos de integración, aprendizaje y memoria. Aunque se han descrito, toda una gama de efectos neuronales posteriores a la administración aguda y crónica de esta citokina, los mecanismos de acción que provocan tales efectos son aún desconocidos.

La participación de los receptores típicos inmunológicos al IFN- $\alpha$  en estos procesos neurales parece ser nula; primero porque su existencia en neuronas típicas no ha sido descrita, porque su actividad es específica de especie y también porque estas acciones neuronales son desencadenadas por IFN- $\alpha$  proveniente de varias especies animales. Finalmente la cinética de las acciones neuronales de esta citokina siguen fundamentalmente un mecanismo de acción a nivel de membrana celular que no implica un efecto genómico inmediato.

Por otra parte, todos los efectos de esta citokina indican un mecanismo de acción, cuya alteración se manifiesta en múltiples acciones a nivel neuronal. Esto es, que el IFN- $\alpha$  podría estar actuando sobre procesos fundamentales de la fisiología nerviosa, como es el caso de los flujos iónicos transmembranales. Así, una modificación en tal proceso, provocaría cambios en todas las funciones cerebrales, tal como se observa después de la aplicación repetida de IFN- $\alpha$ .

De todos los flujos transmembranales, quizá el flujo de iones calcio sea uno de los primordiales eventos en los mecanismos de la fisiología cerebral. La concentración intracelular de este ion es fundamental en procesos celulares como crecimiento, diferenciación, desarrollo y muerte, acciones que se demostró que son moduladas también por el IFN- $\alpha$ . El ion calcio reviste particular importancia en los procesos de señalización que ocurren entre las interacciones de la membrana celular con diferentes ligandos y la actividad genómica. La concentración de calcio es mantenida y regulada por procesos que modulan su entrada desde el medio extracelular. Estos mecanismos incluyen la entrada de calcio mediante canales de calcio dependientes de voltaje, o bien por mecanismos independientes del mismo. La liberación de este ion desde los almacenes

intracelulares y por sistemas de amortiguamiento que incluyen proteínas fijadoras de Calcio, constituyen otro sistema importante en el mantenimiento homeostático de este ion en el organismo

De esta manera, si el IFN- $\alpha$  modifica el flujo de  $Ca^{2+}$  en las neuronas, es de esperarse algunos cambios, primero en la excitabilidad celular puesto que se reduce la entrada de un ion positivo al interior de la célula, con el consecuente cambio en el potencial de membrana y en la excitabilidad celular, manifestandose como cambios en el patrón y la frecuencia de descarga neuronal. Lo que ha sido descrito para esta citokina. Si los efectos del IFN- $\alpha$ , son suficientemente intensos o prolongados entonces otro tipo de actividad celular tenderá a modificarse como consecuencia de un cambio en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ . Por ejemplo, habrá cambios en los procesos que son modulados por los cambios en la concentración de este ion, tales como la liberación de neurotransmisores y hormonas, en la propia homeostasis intracelular de  $Ca^{2+}$  e incluso en procesos estructurales como la replicación, diferenciación y desarrollo celular, así como en funciones de plasticidad los cuales también tienen dependencia de esta concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ .

El presente trabajo intenta determinar el efecto del IFN- $\alpha$  sobre los flujos transmembranales de calcio, que responden a la actividad de canales dependientes de voltaje. Para ello inicialmente se caracterizó el efecto del IFN- $\alpha$  en células de la región CA1 provenientes de rebanadas de hipocampo de rata, el cual es una estructura altamente sensible a la citokina y que presenta amplias ventajas metodológicas para su estudio. Esta caracterización nos permitió determinar el patrón de respuesta de esta estructura en presencia IFN- $\alpha$ .

Posteriormente, a través del empleo de la técnica de fijación de voltaje en porciones de membrana, configuración de célula completa, se analizó el efecto del IFN- $\alpha$  sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$ . Estos estudios se realizaron en células hipocampales cultivadas de embriones de rata.

## **OBJETIVOS.**

-Caracterizar el efecto de diferentes concentraciones de IFN- $\alpha$  , sobre la frecuencia de descarga de las neuronas de la región CA1 del hipocampo en rebanadas de cerebro de rata, utilizando registros extracelulares, para determinar el patrón de actividad eléctrica de esta estructura cerebral, en presencia de la citokina.

-Analizar los cambios en la corriente entrante de calcio, cuando se aplican diferentes concentraciones de IFN- $\alpha$  en células cultivadas provenientes de hipocampo de embrión de rata mediante registros de fijación de voltaje, para identificar electrofisiológicamente el canal iónico afectado por la citokina y el posible mecanismo de acción de esta sustancia, que se lleva a cabo en éstas células.

## **HIPOTESIS.**

El hipocampo es una estructura cerebral altamente sensible a los efectos del IFN- $\alpha$  por lo que, la aplicación de esta citokina sobre células hipocámpales, provocará cambios sobre parámetros eléctricos como la frecuencia de descarga, lo cual constituye un fenómeno subyacente de los efectos colaterales provocados por la citokina después de su administración.

Si el IFN- $\alpha$  modifica la excitabilidad de las células hipocámpales por modificar la permeabilidad de algunos iones como el  $\text{Ca}^{2+}$ , entonces, su aplicación a células cultivadas de hipocampo provocará cambios en el flujo transmembranal del calcio, posiblemente a través de canales dependientes de voltaje.

## **METODOLOGIA.**

En el presente trabajo se utilizaron dos metodologías diferentes: la primera consistió en registros de la actividad extracelular en rebanadas de hipocampo de rata adulta, mientras que en la segunda se realizaron registros de corrientes transmembranales de calcio en células disociadas de hipocampo de embrión de rata.

### REGISTROS EXTRACELULARES EN REBANADAS DE HIPOCAMPO.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 190 a 220g, previamente mantenidas en condiciones de laboratorio durante al menos 15 días antes del experimento. Durante este tiempo los animales se mantuvieron en cajas individuales con acceso libre al agua y alimento (multicubos, Ralston Rations). Las condiciones de luz y oscuridad fueron controladas de tal manera que el ciclo consistía de 13 horas de luz y 11 de oscuridad, iniciándose a las 8:00 hrs. y finalizando a las 21:00 hrs. con una temperatura ambiente de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Al inicio de cada sesión experimental los animales se anestesiaban con éter inhalado durante 25 segundos, suficiente para propiciar una anestesia quirúrgica. Una vez anestesiados, los animales se decapitaban rápidamente utilizando una guillotina. Inmediatamente se removía el cerebro completo y se colocaba en solución Ringer-Krebs-Henseleit (RKH) con la siguiente composición en mM: NaCl, 125; KCl, 5.5;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.25;  $\text{MgSO}_4$ , 2.0;  $\text{CaCl}_2$ , 1.5;  $\text{NaHCO}_3$ , 25; dextrosa, 10. Esta solución se valoró con solución de NaOH 0.1 M hasta un pH=7.4 y se mantenía a  $4^\circ\text{C}$  y aireación continua con una mezcla de  $\text{O}_2$  al 95% y  $\text{CO}_2$  al 5%. El tiempo transcurrido entre la decapitación y la inmersión del cerebro en esta solución, nunca fue mayor a 60 segundos. Una vez inmerso el cerebro en esta solución fría, se permitía un tiempo de 120 segundos de incubación; transcurridos éstos, los dos hemisferios se separaban por un corte mediosagital y se regresaban a la solución fría hasta el momento de obtener las rebanadas, lo cual se lograba de 10 a 15 minutos después.

Antes de hacer las rebanadas, cada hemisferio se cortaba y seccionaba en bloques en un plano longitudinal de acuerdo a la técnica utilizada por Jones y Heinemann<sup>45</sup>. Esta porción del hipocampo se fijaba por el polo lateral del bloque de tejido a la platina de un vibrotomo (Campden Instruments LTD) con unas gotas de cianoacrilato. Una vez fijo el cubo de tejido, se hacían

rebanadas longitudinales, hasta localizar, con la ayuda de un lente de aumento integrado al vibrotomo, la zona en la cual el hipocampo está completo. Las rebanadas obtenidas fueron de 350 a 400  $\mu\text{m}$  de grueso, con lo cual se obtenían de cuatro a seis rebanadas de hipocampo por animal, esto es de dos a tres rebanadas por hemisferio. El nivel de los cortes correspondía aproximadamente a las coordenadas anteroposteriores (AP) de 6.6 a 4.6 mm al punto bregma de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson <sup>66</sup>.

Después de obtenerse, cada rebanada se transfería a una caja de petri de 5 cm de diámetro llena de solución RKII a 4 °C. Aquellas rebanadas que conservaban la estructura hipocampal completa se seleccionaban para ser utilizadas durante el registro. Las rebanadas escogidas se transferían a una cámara de 25 ml llena con solución RKII. Esta cámara se encontraba en baño maría que la mantenía a una temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  y con aireación continua (95 % de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$ ). El tiempo en que permanecieron estas rebanadas para su equilibrio con la solución RKII fue de 90 a 120 minutos, para ser transferidas posteriormente a la cámara de registro.

Se utilizó una cámara de registro para rebanadas de cerebro de rata. Esta consistía de una base de acrílico (10.0 X 7.0 cm), en cuya parte central se encontraba la cámara del baño de registro (3.5 cm de diámetro y 1.0 cm de altura) con una capacidad de 6 ml, en donde se colocaba la rebanada. La cámara poseía una base de vidrio intercambiable que constituía de un porta objetos (4cm X 5 cm), fijado a la cámara con parafina a lo largo de todo su borde. La cámara de registro se colocaba sobre la platina de un microscopio óptico (Carl Zeiss) y el tejido se transfería a la parte superior de un anillo de teflón cubierto con una malla de nilón colocado en la cámara de registro. Todo este sistema se encontraba sobre una mesa vibroaislante (Vibration Isolated Workstation, Newport) y dentro de una cámara de Faraday con la finalidad de aislar los ruidos eléctricos ajenos al registro celular.

La solución RKII se perfundía a la cámara de registro a una temperatura de  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$  mediante un sistema de contracorriente, el cual consistía de un sistema de perfusión que empleaba una bomba que hacía circular agua caliente ( $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) por un tubo de mayor calibre (2.40 X 3.8 mm, diámetros interno y externo, respectivamente), mientras que la solución de infusión circulaba, gracias a la acción de la gravedad, por un tubo de menor calibre (1.19 X 1.70 mm, diámetros interno y externo, respectivamente), localizado dentro del primero (Fig. 4). Tal arreglo permitía una transferencia de calor desde el agua caliente hacia la solución, de tal manera que cuando la solución de infusión alcanzaba la cámara de baño donde estaba la rebanada de

cerebro, su temperatura era de  $35 \pm 0.5$  °C. La velocidad de flujo de la solución de perfusión en el sistema de baño fue de 1.5 a 2.0 ml/min, velocidad óptima para registros extracelulares <sup>47</sup>. En estos experimentos nunca se alcanzaron temperaturas mayores a 35°C durante el registro, debido a la disminución de viabilidad en las rebanadas, cuando esto ocurría, se observaba un incremento sustancial en la actividad unitaria de fondo y la presencia de descargas en ráfaga de aparición azarosa en la región CA1.

Después de estabilizado el tejido, se iniciaba el registro extracelular unitario en las neuronas hipocámpales. Para lo cual, se introducía, sobre la zona de células piramidales de la región CA1, una micropipeta de vidrio llena con solución de NaCl a una concentración 4.0 M y saturada con verde rápido (Fast Green), esto, con la ayuda del microscopio óptico y un micromanipulador (Newport MX300R). La micropipeta de registro se hizo con una pipeta de borosilicato, estirada en un estirador vertical de un solo paso (David Kopf Instruments, modelo 700C), usando una resistencia de 15 amperios, lo que permitía obtener un diámetro en la punta de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . Los electrodos de tierra y de referencia se colocaban en el baño y en la mesa de registro, respectivamente. Todos los electrodos incluyendo el de registro, estaban conectados a una sonda de alta impedancia (Grass), y ésta a su vez, al preamplificador (Grass P5 AC) acoplado a una fuente de poder (Grass RPS 107). La señal de la actividad eléctrica era visualizada en un osciloscopio (Tektronix 2225) y transmitida a un audiomonitor (Grass AM8).

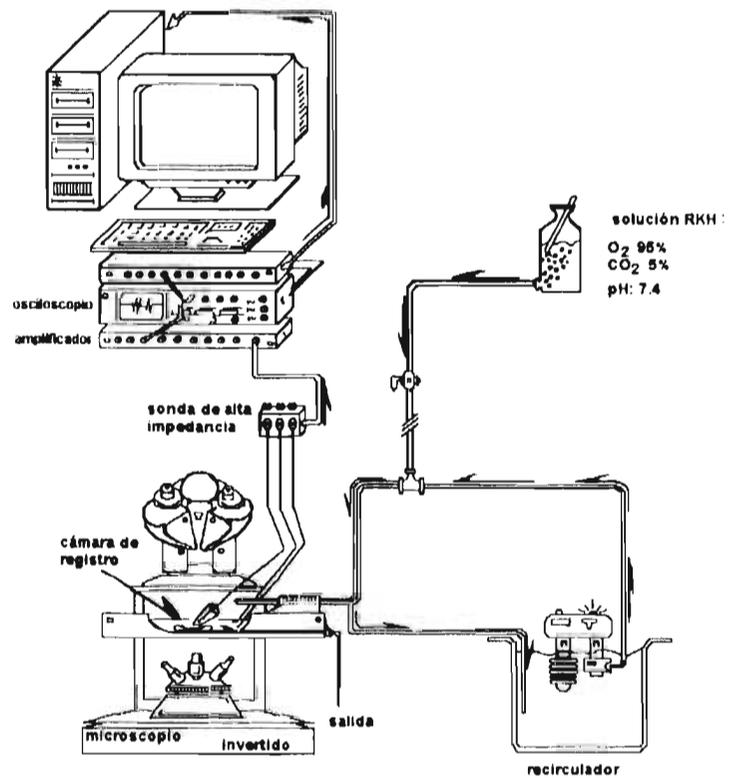


FIG. 4.- Representación esquemática del sistema empleado en el registro de rebanadas de cerebro. En A se muestra la cámara húmeda donde se introducía la rebanada. Se observa la poza de entrada de la solución y la poza de succión, por donde se elimina esta solución una vez que había bañado la rebanada. La velocidad de flujo fue ajustada a 1.5 ml/min. En B se muestra el sistema de perfusión que calentaba la solución a través de un sistema de contracorriente.

Las señales registradas fueron procesadas primero con el preamplificador, el cual tiene un filtro fijo 60 Hz y filtros para purificar la señal, de baja frecuencia (300 Hz) y de alta frecuencia (1 KHz), usando siempre una amplificación de 50 X 100. La señal era visualizada en el osciloscopio y una vez amplificada se capturaba mediante un convertidor analógico-digital, la señal era digitalizada a 8 KHz por canal. Con el empleo de una ventana discriminadora se capturaban sólo aquellas espigas que mostraron un tamaño y frecuencia uniforme. La amplitud de la ventana discriminadora, con un valor mínimo y máximo de voltaje, era determinada automáticamente por el programa de captura, con base en la amplitud de la espiga registrada. Estas señales se enviaban a una computadora PC (Relisys), la cual tenía una tarjeta convertidora analógica-digital para la captura y análisis de datos (Computerscope, R.C. Electronics). La frecuencia de eventos contra tiempo fueron muestreadas cada 4 seg durante periodos de 15 min, grabadas y almacenadas en discos flexibles de 3.5" (2HD Verbatim), para su posterior análisis.

Los experimentos se realizaron en 5 periodos de 15 min cada uno. La actividad eléctrica basal de la región CA1 de células piramidales del hipocampo, se registraba durante el primer periodo. Al inicio del segundo periodo se realizaba la aplicación directa de 50 µl de solución que contenía IFN-α a diferentes concentraciones, y se mantenía en el baño durante 5 min. Una vez finalizado este tiempo se reiniciaba la perfusión de la solución RKH, para continuar el registro hasta completar 75 min de registro total.

Las concentraciones finales utilizadas de IFN-α fueron de  $4.1 \times 10^{-4}$ ,  $8.2 \times 10^{-4}$ ,  $1.6 \times 10^{-3}$ ,  $3.28 \times 10^{-3}$  y  $6.56 \times 10^{-3}$  pM, que corresponde a la aplicación de 375, 750, 1500, 3000 y 6000 UI respectivamente y con una actividad específica de  $2.4 \times 10^6$  UI por mg de proteína. Los resultados obtenidos con la aplicación de cada una de estas dosis fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de proporción crítica de McNemar<sup>56</sup>. Para ello se comparó el total de espigas durante cada uno de los periodos de 15 min con el número total de espigas registradas en los 15 min preadministración. Un valor mayor o menor a 1.96 implica un cambio significativo ( $p \leq 0.05$ ) de acuerdo a la distribución normal Z. Una vez determinado que la proporción del cambio en la actividad eléctrica en presencia de IFN-α, era estadísticamente significativo, se compararon estos resultados con los observados en el grupo control, utilizando para ello la prueba de  $X^2$ <sup>39</sup>.

## CULTIVO CELULAR

Se utilizaron embriones de rata de la cepa Wistar, con un periodo de gestación de entre 18 a 21 días, con la finalidad de obtener productos embrionarios lo más desarrollados posible. Durante todo el periodo de gestación las madres fueron mantenidas en condiciones ambientales constantes en el bioterio con ciclo de luz-obscuridad de 13 - 11 hrs con el inicio del fotoperiodo a las 8:00 A.M. y con acceso libre al agua y alimento (Multicubos, ralston Rations) y a una temperatura ambiente de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Para la preparación del cultivo, la rata se colocaba en una cámara de anestesia con éter y una vez en el plano quirúrgico, el animal se sacrificaba por decapitación, colocándolo inmediatamente en una plancha de cirugía cubierta con papel aluminio limpio y con asepsia con una solución benzal en una dilución de 1:100. Adicionalmente, se realizaba la asepsia de la región ventral correspondiente para evitar la contaminación, utilizando material quirúrgico estéril, se procedía a la disección por planos de la piel del vientre y en seguida del músculo que cubre los órganos viscerales y reproductor. Evitando en lo posible toda contaminación, los embriones se extraían y colocaban rápidamente (aproximadamente en 5min) en una caja de petri con solución de fosfatos amortiguadora libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS), a una temperatura de  $4^\circ\text{C}$  y con la siguiente composición química en mM: NaCl, 142; KCl, 5;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1; Hepes, 10; Glucosa, 15, titulada con bicarbonato de sodio hasta alcanzar un pH de 7.40.

Enseguida, los embriones se colocaban sobre un recipiente con hielo dentro de una campana de flujo laminar, para continuar el procedimiento bajo condiciones estériles. Los embriones se decapitaban y se les extraía el cerebro, colocándolos en cajas de petri (diámetro de 7 cm) con solución PBS a  $4^\circ\text{C}$ . Se procedía entonces a realizar, con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Olympus CO11), la disección del hipocampo de cada cerebro. El número de embriones empleado para cada preparación fue de 6, lo cual permitía obtener suficientes células para cultivar aproximadamente de 10 a 15 cajas, con una densidad de 150.000 a 200.000 células por caja. Los hipocampos disecados eran colocados rápidamente en un tubo de centrifuga estéril que contenía solución PBS también a  $4^\circ\text{C}$ . Con esta solución y con la ayuda de una pipeta sérica estéril el tejido se lavaba y decantaba en dos ocasiones. Posteriormente se adicionaban 3 ml de una solución de tripsina (GIBCO BRL) disuelta en PBS a una concentración de 1 mg/ml y filtrada

(Whatman 22). Esta proteína se empleaba para realizar la disociación enzimática de las células hipocámpales y la fragmentación de tejido no neural. Para facilitar la trituración del tejido, se realizaba la succión del mismo en tres ocasiones, con una pipeta serológica. Una vez añadida la enzima, los tubos se colocaban en baño maría a 37 °C, durante un periodo de 15 a 20 min (dependiendo de la edad del embrión), para que ésta pudiera iniciar la acción enzimática de la proteína.

Al finalizar el periodo de inactivación, se agitaba el tejido, empleando una pipeta serológica, hasta que se obtenía un homogenizado. En caso de que éste no fuese completa se procedía a incubar nuevamente durante otros 5 min. En este paso se evitaba la formación de burbujas de aire dentro de la solución, para evitar la muerte de las células<sup>15</sup>.

Una vez que se obtenía una solución homogénea, se bloqueaba la acción de la enzima sobre el tejido, por la adición de 7 ml de inhibidor de tripsina (GIBCO BRL) a una concentración de 2 mg/ml disueltos en una solución que contenía medio de cultivo D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), cuya composición es: glucosa al 10%; glutamina, 2 mM; insulina 0.40 µg/ml; albúmina, 1 mg/ml; penicilina-estreptomicina al 10%; colorante rojo de fenol, suero fetal bovino (SFB) al 10%. Inmediatamente se centrifugaban en tres ocasiones a 3000 RPM durante 10 min, el sobrenadante se eliminaba con una pipeta serológica. Al final el botón celular se resuspendía en 5 ml de D-MEM para proceder a calcular el número de neuronas viables. Para ello, se mezclaban 500 µl de solución de azul de tripán al 1% con 500 µl de resuspensión celular, esta mezcla se colocaba en un hemocitómetro con la ayuda de una pipeta. Las células se contaban en las 4 cuadrículas centrales, tomando en cuenta sólo las células viables. Se calculaba el promedio y empleando la siguiente fórmula se calculaba el número de células por 1 cm<sup>3</sup>.

$$\text{No. de células viables/ml} = N \times 2 \times 10^4$$

Donde N= número de células.

Después se calculaba el volumen a cultivar por caja, tomando en cuenta un porcentaje de viabilidad celular del 80 al 90%.

Las cajas de cultivo (FALCON 3.5 cms) se preparaban un día antes del cultivo para esto se agregaban 60 µl de solución de sustrato de L-polihsina a una concentración de 1 mg/ml la cual se retiraba al momento del cultivo mediante sucesivos lavados con agua deionizada estéril. Se añadían 2 ml de medio D-MEM estéril con SFB al 10% y se colocaba un anillo de teflón en el centro de cada caja de cultivo.

La siembra se realizaba añadiendo el volumen celular correspondiente al número de células que se deseaba sembrar, dentro del anillo de teflón. Inmediatamente las cajas se pasaban a un incubador, bajo condiciones estándar de temperatura (37 °C) y una atmósfera de 5% aire y 95% CO<sub>2</sub>.

Después de aproximadamente 5 hrs de incubación, los anillos de teflón se retiraban y a las 24 hrs se hacía un cambio de medio, y se observaban las células, al microscopio de contraste de fases, lo que permitía eliminar en caso necesario, las cajas con demasiadas células muertas. Posteriormente el cambio de medio se llevaba a cabo cada 3 días con la correspondiente observación de las células cultivadas. Toda la técnica se realizó lo más rápido posible y bajo condiciones de esterilidad para evitar la contaminación.

Con fines comparativos, se realizaron registros de fijación de voltaje, en células disociadas provenientes del ganglio cervical superior de rata macho de la cepa Wistar, con una edad aproximada de 4 semanas. Estas células se obtuvieron de acuerdo a la técnica descrita por Bottenstein y Sato <sup>12,97</sup>.

#### REGISTROS DE CORRIENTES DE CALCIO

En esta parte del proyecto se utilizaron células piramidales cultivadas de la región de hipocampo. En cada sesión de registro, se seleccionaba una caja de células, a la cual se le cambiaba el medio de cultivo por solución de registro a temperatura ambiente. Las células se mantenían en esta solución por lo menos 30 min para su estabilización en su nuevo medio. Dentro de una caja de Faraday se localizaba una mesa neumática (Newport) que aísla al sistema de registro de las vibraciones mecánicas externas. Sobre ésta, se localizaba un microscopio óptico invertido (Carl Zeiss) y en él la cámara de registro y el micromanipulador neumático (Eppendorf 5171) que sostenía la sonda de registro y permitía direccionar y colocar el electrodo de registro llen de solución interna (ver adelante) aproximadamente a 0.1 µm de distancia, para acercarlos a las células y efectuar el sello entre éste y la célula.

El acercamiento del microelectrodo de registro hacia la célula fue visualizado mediante el microscopio invertido usando siempre el objetivo de 40X. Sobre el micromanipulador se colocaba la sonda de registro (CV4-Headstage Axon-instruments, USA) la cual se conectaba al amplificador para fijación de voltaje (Axopatch-1D Axon-instruments, USA). La señal de salida de éste,

alimentaba una interfase analógica-digital (Digidata 1200, Axon-instruments, USA) conectada a una computadora PC (Digital, Venturis) donde se encontraba instalado el programa pCLAMP6.0 (Axon-instruments,USA). Este sistema de registro, captura, almacenamiento y análisis de datos permitía registrar las corrientes de  $Ca^{2+}$  presentes en las células cultivadas del hipocampo. La salida del amplificador también se conectó a un osciloscopio (Tektronix) lo cual permitía seguir el proceso de sellado y de registro de corriente.

Las micropipetas de registro usadas para la fijación de voltaje en porciones de membrana, eran de pipetas de borosilicato (diámetro externo 1.5 a 2.0 mm y diámetro interno 1.5 a 1.2 mm) estradas en un programa de tres etapas, empleando un estrador de pipetas horizontal (SUTTER A8). Estas pipetas fueron pulidas con una microforja (Narishige, MF-83). El diámetro de la punta de la pipeta con el borde pulido fue de aproximadamente 3.0  $\mu m$ . La pipeta de registro se llenaba con una solución interna de registro cuya composición en mM fue la siguiente: CsCl, 130; EGTA, 10; Hepes, 10;  $MgCl_2$ , 2; MgATP, 5, y valorada con solución de CsOH hasta un pH =7.4. Por el CsCl presente en esta solución se pudieron aislar las corrientes de potasio en el registro.

Para realizar los registros de corrientes iónicas, se llevó a cabo la técnica de fijación de voltaje en porciones de membrana configuración célula completa, la cual permitía evaluar el efecto del IFN- $\alpha$  sobre la excitabilidad neuronal, por la medición de las corrientes de  $Ca^{2+}$ .

Para realizar el sello entre la pipeta de registro y la célula, se aplicó un pulso de voltaje de -0.5 mV y al mismo tiempo se monitoreó la resistencia de la pipeta. Una vez que la pipeta tocaba la célula, la resistencia se incrementaba, por lo que el pulso tendía a disminuir en amplitud. Se aplicaba entonces, una leve presión negativa al interior de la pipeta hasta que una porción de la membrana celular entraba a la punta de la pipeta de registro, lo que se evidenciaba por una completa desaparición del pulso <sup>35</sup>. Después de la formación del sello, se rompía deliberadamente la porción de membrana celular atrapada dentro de la pipeta por medio de la aplicación de una ligera presión negativa, acompañada de una pequeña vibración mecánica aplicada mediante el amplificador. Una vez rota la membrana se lograba la configuración de célula completa. El rompimiento de una pequeña porción de membrana se visualizaba por un repentino aumento en la corriente capacitiva.

Una vez formado el sello de alta resistencia ( $> 10 \Omega$ ) se realizaban los registros de las corrientes de calcio, en las neuronas hipocampales en cultivo, utilizando una solución externa con la siguiente composición en mM: NaCl, 120;  $CaCl_2$ , 10;  $MgCl_2$ , 2; Hepes, 10 y tetrodotoxina (TTX).

0.2., este último fármaco permitió el bloqueo de corrientes de sodio en el registro. La aplicación de las soluciones se realizó por perfusión controlada por un sistema de válvulas. El sistema consistía de una serie de jeringas de 20ml de capacidad, conectadas a tubos de polietileno (no. 27), los que a su vez se dirigían hacia una sola salida que bañaba directamente la célula que se estaba registrando. Dentro de la caja de cultivo se colocaba un tubo conectado a una bomba de vacío lo que permitía mantener un volumen constante dentro de la caja de registro. Cada una de las jeringas contenía una solución diferente: una solución externa y las otras solución externa con diferentes concentraciones de IFN- $\alpha$ .

El protocolo usado para registrar las corrientes de Ca<sup>2+</sup>, fue el siguiente: se aplicaban pulsos de voltaje de 10 mV con una duración de 10 mseg y una frecuencia de 0.33 Hz; desde un valor de fijación de membrana de -80mV, para llevar el potencial de membrana a -70, -60, -50 y así sucesivamente hasta llegar a +50 mV. En otras palabras, el protocolo de estimulación consistía de una serie con 13 pulsos o episodios y en cada uno, un muestreo de 256 puntos, a una velocidad de captura de 5 KHz. Los registros se realizaban bajo condiciones control, es decir en ausencia del IFN- $\alpha$  y registros con la aplicación de la citokina a diferentes concentraciones. Enseguida, se eliminaba el IFN- $\alpha$  del medio y se continuaba registrando la corriente post administración. Todo esto en la misma célula, y con el fin de evaluar los efectos del IFN- $\alpha$  sobre las corrientes de calcio y la dependencia de voltaje de las mismas. Con los valores de corrientes de Ca<sup>2+</sup> obtenidos en cada uno de los pulsos depolarizantes aplicados, se construyeron las curvas corriente - voltaje (I-V), para cada condición experimental.

También se analizó el efecto de la citokina en el tiempo, mediante un protocolo de curso temporal, el cual consistía de la aplicación de un voltaje de mantenimiento a -80 mV y se aplicaban pulsos de 10 mV con una duración de 10 mseg. Las concentraciones de IFN- $\alpha$  empleadas para ambos protocolos de registro fueron de  $5.48 \times 10^{-4}$ ,  $1.64 \times 10^{-3}$  y  $2.74 \times 10^{-3}$  pM lo cual corresponde a 2500, 7500 y 12500 UI, de un IFN- $\alpha$  con actividad específica de  $2.4 \times 10^8$ .

Para estimar la confiabilidad de los resultados, se realizó primero una prueba de ANOVA la cual permitió determinar la homogeneidad de varianzas en los grupos de tratamiento. Finalmente con el empleo de la prueba de F de Tukey se determinaron las diferencias significativas entre los registros con la aplicación de IFN- $\alpha$  a diferentes concentraciones<sup>30</sup>. Mediante este procedimiento estadístico se compararon los valores de la corriente máxima y la corriente total durante la situación control y aquella registrada por efecto del fármaco.

## RESULTADOS.

### REGISTROS EXTRACELULARES EN REBANADAS DE HIPOCAMPO.

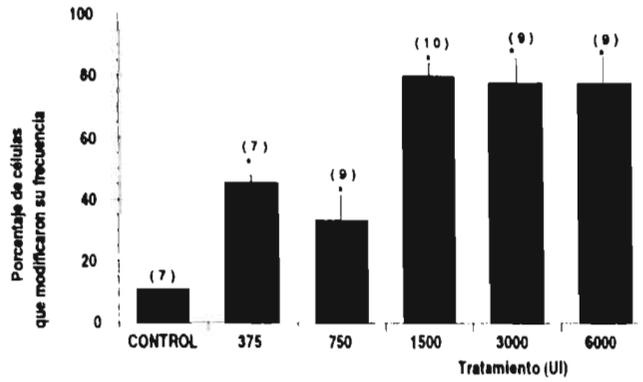
Se utilizaron 88 rebanadas de hipocampo provenientes de 63 ratas. Del total de registros provenientes de estas rebanadas, sólo 51 reunieron las características necesarias para ser consideradas en el análisis posterior. Tales requerimientos incluían que la rebanada mostrara actividad eléctrica uniforme, es decir que su frecuencia de descarga fuera constante, a lo largo de un periodo no menor a 120 minutos que comprendía el tiempo de estabilización y registro. También, que la administración del IFN- $\alpha$  no provocara cambios que perturbaran las características basales de frecuencia de descarga de los registros, y que los electrodos se hayan colocado en la zona específica elegida, es decir en el estrato piramidal de la región CA1 del hipocampo.

La actividad eléctrica registrada consistía de potenciales de acción con una amplitud de aproximadamente 2 mV, la cual mostró una proporción espiga-ruido de aproximadamente 3:1. En su mayoría (95%) se trató de espigas únicas, trifásicas con un patrón de negatividad - positividad - negatividad y cuyas frecuencias se mantuvieron en un rango de 0.62 a 1.89 espigas por segundo con un promedio de  $1.12 \pm 0.42$  Hz.

No se detectaron cambios importantes ni en el patrón ni en el tamaño de estas espigas durante todo el tiempo en que se realizó el registro. De igual forma, ni la aplicación del IFN- $\alpha$ , ni la reducción en el flujo de perfusión, provocada por la administración de la solución vehículo utilizada como control, modificaron parámetros como el patrón y el tamaño de estas señales eléctricas, su efecto se reflejó exclusivamente sobre la frecuencia de descarga neuronal.

Del total de 51 rebanadas 7 de ellas se realizaron bajo condiciones control, es decir a estas neuronas sólo se les administró la solución vehículo (50 $\mu$ l de albúmina humana al 2%). A diferencia de lo que ocurrió con las rebanadas a las que se les administró el vehículo, la aplicación de cualquier concentración de IFN- $\alpha$  provocó cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en la frecuencia de descarga de la mayoría de las células analizadas, con respecto a la actividad observada en los registros control. Este efecto fue dependiente de la concentración aplicada (Fig. 5).

A



B

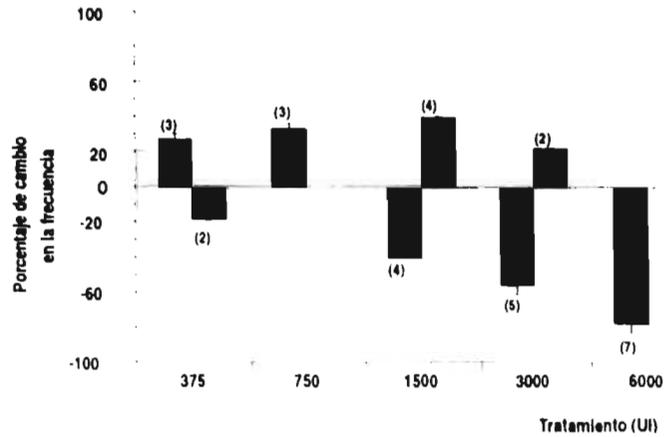


FIG. 5.- La gráfica A muestra la relación entre el porcentaje de células que modificaron su frecuencia de descarga y las diferentes concentraciones de IFN- $\alpha$  empleadas. La gráfica B representa la proporción de cambio en la frecuencia de descarga, lo cual fue dependiente de la concentración administrada. Los números en paréntesis indican el número de células.

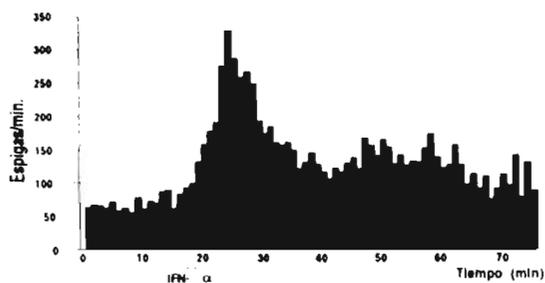
La proporción de células que modificaron su frecuencia de disparo, fue dependiente de la concentración, independientemente de la dirección del cambio. Así, la proporción de células que mostraron un cambio mayor a la administración de la citokina fueron aquellas que recibieron concentraciones altas, desde 1500 hasta 6000 UI (Fig 5 A y cuadro 2). Sin embargo las concentraciones más bajas también provocaron que un porcentaje menor de células respondieran (Fig. 5 A). En cuanto a la dirección del cambio, se mostró que el IFN- $\alpha$  a concentraciones de 375 y 750 UI aumentaban su frecuencia de descarga de manera significativa al compararse con el control, por el contrario las concentraciones altas de 3000 y 6000 UI de la citokina, predominantemente produjeron una disminución de la actividad eléctrica celular. De manera notable, las células que fueron tratadas con 1500 UI de IFN- $\alpha$ , provocaron cambios tanto de aumento como de disminución en la misma proporción (Fig 5 B).

La concentración más baja de IFN- $\alpha$  utilizada fue de  $4.1 \times 10^{-4}$   $\mu$ M la cual corresponde a 375 UI de IFN- $\alpha$ , con una actividad específica de  $2.5 \times 10^6$  UI/mg de proteína. Esta concentración se probó en 7 rebanadas. El 18.2% de las células así registradas respondieron con una disminución en su frecuencia de descarga, efecto que se presentó casi inmediatamente después de añadida la citokina, y permaneció durante todo el registro postadministración. Con esta misma concentración 27.3% de las células aumentaron su frecuencia de disparo, mientras que el resto no mostró un cambio significativo ( $p > 0.05$ ) (Fig. 5B). El patrón de distribución de estas respuestas fueron significativamente diferentes a los observados en el grupo control ( $p < 0.05$ ,  $\chi^2$ ). Cabe mencionar que las respuestas no fueron del todo constantes, ya que mostraron oscilaciones a lo largo de los registros.

La siguiente concentración utilizada en las rebanadas fue de  $8.2 \times 10^{-4}$   $\mu$ M (750UI) esta concentración se aplicó en 10 rebanadas, en las cuales el IFN- $\alpha$  sólo tuvo efectos sobre el 33.3% con un aumento en su frecuencia de descarga (Fig. 5B). En el 66.7% restante no se encontraron modificaciones sobre ningún parámetro observado con respecto al control. El efecto de la citokina sobre la frecuencia de descarga, se manifestó de 3 a 4 minutos posteriores a su aplicación y la respuesta se mantuvo durante aproximadamente 30 minutos. Generalmente este efecto mostró oscilaciones en la frecuencia de descarga. Sin embargo la frecuencia se recuperaba, aunque la célula mostraba una actividad irregular.

Es necesario mencionar que una vez que se establecía la dirección de la frecuencia (i.e. aumento o disminución) ésta no varió con respecto al tiempo, es decir, no se observaron respuestas bifásicas con alguna de las concentraciones administradas.

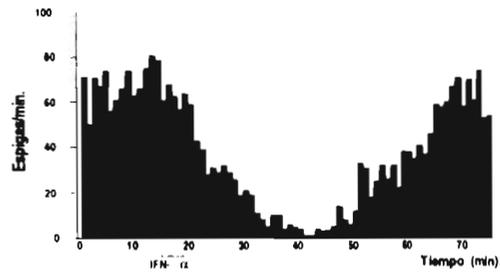
En el caso de la administración de la siguiente concentración la cual fue de  $1.6 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ , correspondiente a 1500 UI de IFN- $\alpha$  aplicada en 10 preparaciones de rebanadas hipocampales, el 80% de las células modificaron su frecuencia de descarga de manera significativa ( $p=0.004$ ), y sólo un 20% no mostró cambio estadísticamente significativo alguno ( $p>0.05$ ). El tipo de respuesta fue muy similar a la observada con la dosis previa aunque, en la mayoría de los casos, no se observó una recuperación total de la frecuencia después de 45 minutos de lavado el tejido (Fig. 6). Adicionalmente, el efecto fue hasta de 10 veces el valor observado en condiciones basales. Del total de células que respondieron a la presencia del IFN- $\alpha$ , el 40% de las mismas mostraron incrementos en la actividad y el 40% restante decrementos



**FIG. 6.-** Histograma de frecuencias de los efectos provocados por una concentración de 1500 UI de IFN- $\alpha$ . Dosis menores indujeron principalmente un incremento de la actividad eléctrica, el cual en la mayoría de los casos se mantenía más allá del tiempo de administración. En algunos casos este efecto se observó durante todo el tiempo de registro.

En 9 rebanadas de hipocampo se administró  $3.28 \times 10^{-3} \mu\text{M}$  de IFN- $\alpha$ , lo que corresponde a 3000 UI. En estas circunstancias el 22.2% de neuronas registradas, mostró un aumento en la frecuencia de descarga, acción que perduró durante todo el tiempo de registro. Otro 55.6% presentó una disminución en su actividad eléctrica celular, lo cual también perduró durante todo el registro. En el resto de las células no se detectaron cambios significativos ( $p > 0.05$ ) por la aplicación de IFN- $\alpha$ .

Cuando se realizaron experimentos con una concentración de  $6.56 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ , las cuales corresponden a 6000 UI de IFN- $\alpha$  se encontró que el 77.8% de las neuronas registradas, mostraron una disminución significativa ( $p = 0.016$ ) de su frecuencia basal y el porcentaje restante no respondió con cambios significativos ( $p > 0.05$ ). Nuevamente este efecto perduró durante casi todo el tiempo de registro (Fig. 7).



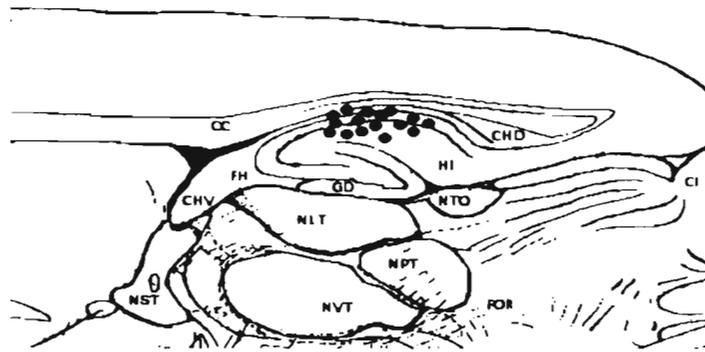
**Fig.7.-** La administración de las concentraciones más altas de IFN- $\alpha$ , usadas en el presente trabajo, (3000 y 6000 UI) se caracterizaron por provocar principalmente decrementos en la frecuencia de descarga neuronal. Estos efectos se presentaron a los pocos segundos de iniciada la administración de la citokina. La gráfica representa el efecto provocado por 6000 UI de la citokina.

Los resultados de la aplicación de diferentes concentraciones de IFN- $\alpha$  sobre el número de células hipocámpales, que responden con cambios en su frecuencia, se resumen en el cuadro 2; en el cual se muestran los valores estadísticos encontrados en la prueba de X<sup>2</sup> al comparar la actividad eléctrica en condiciones basales con aquellas observadas después de aplicada la citokina. La aplicación de cualquier dosis de IFN- $\alpha$  modificó significativamente ( $p < 0.05$ ) esta actividad eléctrica.

Los resultados histológicos mostraron que la mayoría de los sitios de registro se localizaron en el estratum piramidal de la región CA1 del hipocampo, algunos otros se encontraron en los otros estratos de la misma región. Sin embargo, no se observó una correlación entre el sitio de registro y la sensibilidad o dirección del efecto inducido por la administración del IFN- $\alpha$ . Por lo que las células que son sensibles al IFN- $\alpha$  no mostraron distinción especial alguna (Fig. 8)

**CUADRO 2.- Se resumen los resultados obtenidos con la aplicación de 5 diferentes concentraciones de IFN- $\alpha$ . El porcentaje de respuesta (aumento, disminución o no respuesta) esta representado en los paréntesis, mientras que los números fuera de ellos representan el número de células afectadas. \*  $p < 0.05$**

concentración de IFN- $\alpha$ .	aumento	disminución	no respuesta
375 UI *	3(27.3)	2(18.2)	6(54.5)
750 UI *	3(33.3)	0(0)	6(66.7)
1500 UI *	4(40)	4(40)	2(20)
3000 UI *	2(22.2)	5(55.6)	2(22.2)
6000 UI *	0(0)	7(77.8)	2(22.2)



**FIG.8.- Plano longitudinal estereotáxico correspondientes de 6.6 a 4.6 mm anteroposteriores al punto bregma de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson <sup>58</sup>. Se muestran, en la región hipocampal (HI), los puntos que representan a la mayor parte de los sitios de registro, independientemente de la dirección de la respuesta, de neuronas que respondieron a la aplicación del IFN- $\alpha$ . Cuerpo calloso (CC); fimbria hipocampal (FH); comisura dorsal del hipocampo (CHD); comisura ventral del hipocampo (CHV); coliculus inferior (CI); giro dentado (GD); núcleo lateral talámico (NLT); núcleo ventral talámico (NVT); núcleo posterior talámico (NPT); fórnix (FOR); núcleo de la estria terminalis (NST); núcleo del tracto óptico (NTO).**

#### CULTIVO CELULAR.

Se realizaron 20 preparaciones de cultivos de células de hipocampo con 10 a 15 cajas cada una. Las células se obtuvieron de embriones de rata, con edad gestacional de 18 a 21 días *in útero*. De estos cultivos se obtuvieron 35 registros de células individuales en diferentes etapas del mismo.

Después de 5 horas de realizar la siembra de las células hipocampales en las cajas de cultivo y de recuperar el anillo de teflón de las mismas, los cultivos celulares fueron examinados. El resultado del adecuado manejo de la técnica de cultivo y de una buena disociación del tejido se reflejó en la obtención de cultivos con características de viabilidad de hasta el 80 al 90% de sus células. Después de estas 5 horas de cultivo, las células presentaban forma redonda u ovalada, con la membrana lisa y brillante sin presencia de rugosidades. Algunas células ya presentaban prolongaciones o neuritas rudimentarias (Fig 9A)

Al momento del primer recambio de medio, es decir a las 24 horas de la siembra, las células mantenían las características anteriores, pero se notaba claramente un aumento en el tamaño, el número de prolongaciones y un núcleo más evidente (Fig 9B). Las células examinadas a los 2 y 3 días de cultivo mostraban un claro desarrollo y un núcleo bien definido, aún cuando su tamaño no fue lo suficientemente grande como el de células con mayor desarrollo. En esta etapa de diferenciación se hicieron los registros de corrientes iónicas, las cuales todavía fueron pequeñas, respecto a las corrientes registradas en células con más días de cultivo (Fig 9C, 11).

Los cultivos celulares de 4 a 6 días de cultivo, al microscopio mostraron células completamente desarrolladas, con prolongaciones grandes y diferenciadas con organelos presentes, similares a las células en un organismo completo, es decir, en este periodo resultaba fácilmente distinguible una neurona piramidal del resto de las células (Fig 9D). También en esta etapa, se observó la invasión de los cultivos por células de gha. Estas células no se observaron claramente en las primeras etapas de cultivo debido a la administración de un antimitótico, arabinosido de citosina, que impide su crecimiento<sup>15</sup>

Los cultivos se mantenían viables y en buenas condiciones hasta los 10 y 11 días, a partir de los cuales se empezaban a notar signos de deterioro celular, por ejemplo, se

observaba un incremento en el crecimiento de células gliales y alteraciones en la integridad de la membrana celular de las neuronas. Además, el porcentaje de células vivas disminuía en forma progresiva (Fig 9E y F).

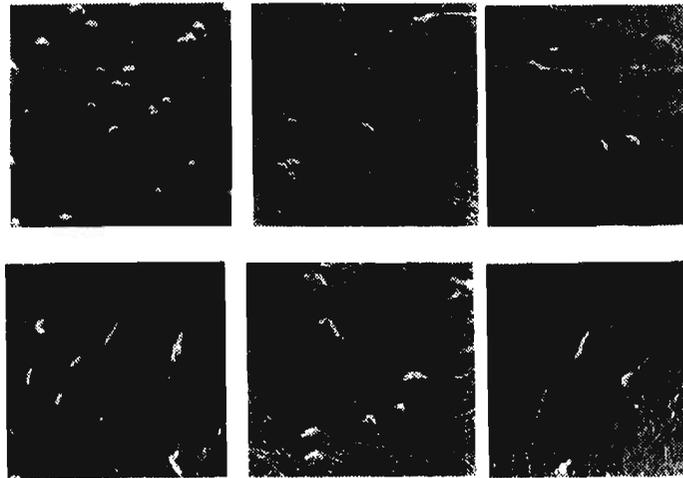


FIG. 9.- Fotografías que muestran el desarrollo celular en un tiempo diferente tiempo de incubación. Estas fotografías fueron tomadas a las 24 horas (B), 3 (C), 6 (D), 10 (E) y 11 (F) días de cultivo. Después de 11 días las células hipocámpales mostraban ya los rasgos característicos de células completamente desarrolladas.

Los cultivos que no mostraron características de viabilidad para un buen registro de actividad, fueron desechados. Los parámetros de exclusión implicaban un porcentaje de viabilidad menor al 80%, células opacas y con una membrana rugosa sin núcleo definido o un cultivo contaminado con microorganismos como hongos o bacterias. Dentro de estos criterios se incluía la presencia de una gran cantidad glia.

#### REGISTROS DE CORRIENTES DE $Ca^{2+}$

De los 83 registros de corrientes de  $Ca^{2+}$  en las células cultivadas de hipocampo de rata, 68 se realizaron bajo el protocolo de pulsos para obtener curvas I-V y 15 con el protocolo de curso temporal.

Una vez que la pipeta se introducía al medio de registro, se aplicaba un pulso de +10mV, el cual se visualizaba en el osciloscopio y se monitoreaba la resistencia del electrodo lo que permitía deducir las condiciones del mismo. La resistencia promedio de los electrodos de registro fue de  $0.24 \pm 0.0047 M\Omega$ . Cuando se hizo el sello y la ruptura de la membrana (Fig. 10), enseguida se compensó la capacitancia de las membranas de las células registradas, ésta en promedio de  $29.40 \pm 12.2 pF$ . La cual se calculó con la siguiente fórmula  $C = Q/V$ , donde Q es la carga del capacitor, V es el valor de pulso de voltaje y C es la capacitancia de la membrana.



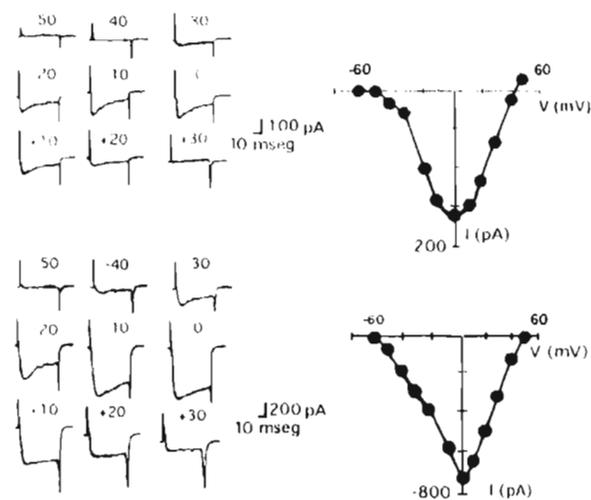
**FIG. 10.- Microfotografía, de una célula piramidal cultivada, en la cual se ha realizado un sello de alta resistencia. Puede observarse la inmediata cercanía entre la membrana de la célula y la punta de la micropipeta.**

Para realizar estos experimentos se emplearon varios cultivos con diferentes edades, sin embargo el 80% de los mismos tenían edades entre 1 y 6 días de cultivo. La diferencia fundamental observada en las células de distintas edades, además de la morfología, fue la amplitud de la corriente registrada, mientras mayor fue la edad de cultivo de las células registradas, mayor era la corriente de calcio registrada. Para descartar la posibilidad de que la diferencia entre la amplitud de la corriente en células de diferente edad, fuera debida a un aumento en la densidad de corriente por el consecuente incremento en la población de canales, se hizo el cálculo de la capacitancia específica. El valor de ésta en células de 2 a 3 días fue de  $11.37 \pm 3.0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , las células de 6 días

tuvieron un valor de  $11.09 \pm 2.8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . El análisis de varianza de estos datos no mostró diferencia significativa alguna ( $p=0.95$ ).

La figura 11 muestra dos registros de las corrientes registradas en dos células con diferente edad de cultivo. Los registros superiores fueron obtenidos de una célula piramidal con dos días de edad; mientras que los registros inferiores se obtuvieron también de una célula piramidal pero con 6 días de edad de cultivo. En el primero se observa que la corriente máxima alcanzó un valor próximo a los 150 pA a un potencial de 0mV, mientras que en la célula de 6 días a este mismo valor de voltaje alcanzó 702 pA. Tal como lo sugieren las curvas I-V de ambos registros, la intensidad de la corriente es la única diferencia importante entre ambas células.

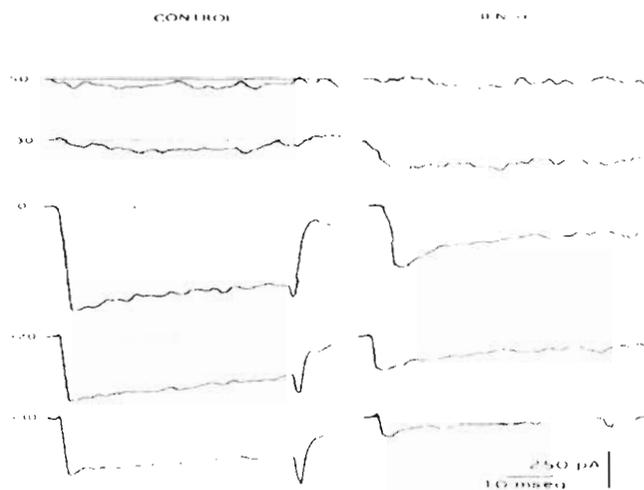
El objetivo principal que se persigue en este estudio consiste en determinar el efecto del IFN  $\alpha$  sobre las corrientes de calcio independientemente de la edad de cultivo; entonces el análisis de los resultados no consideró el tiempo de cultivo como una variable dependiente; por esta razón los registros expresados en porcentaje son la suma, promedio y desviación estándar de todas las células analizadas.



**FIG.11.-Aunque cualitativamente los registros de las corrientes entrantes de  $\text{Ca}^{2+}$  son similares en estas células e independientes del tiempo de incubación, la amplitud de las mismas es dependiente del tiempo de incubación; tal como lo muestra esta figura. Los trazos superiores corresponden a registros realizados en una célula hipocámpal de 3 días, mientras que los inferiores se tomaron a los 6 días.**

El efecto observado después de la aplicación de diferentes concentraciones de IFN- $\alpha$  fue una disminución de las corrientes de calcio. En la figura 12 muestra los registros obtenidos en una célula de 6 días en condiciones control (columna izquierda) y durante la perfusión de 12 500 UI de IFN- $\alpha$  (columna derecha). Comparativamente puede observarse que la citokina reduce el pico de la corriente entrante. En la situación control, la corriente pico se observó cuando el potencial de membrana era de 0 mV y este valor correspondió a -

680 pA, mientras que cuando se aplicó el IFN- $\alpha$ , este valor se redujo a -392.5 pA que corresponde a una reducción del 42% (Fig. 12). Además, en presencia de la citokina la corriente entrante empieza a activarse desde valores de potencial de membrana de -60mV aunque la corriente es muy pequeña. A -30mV la amplitud de la corriente ya es notoria y todavía es mayor que en la situación control a este mismo valor de potencial. A potenciales de membrana más positivos, la amplitud de la corriente es mayor en ausencia del IFN- $\alpha$  que cuando se administra la citokina.



**FIG.12.-** La administración de IFN- $\alpha$  provocó una reducción de la corriente entrante de Ca<sup>2+</sup> y una activación de los canales de calcio desde un valor de voltaje de membrana de -30 mV. La primera columna representa los registros en condiciones control, la segunda columna en presencia de la citokina, en la misma célula.

Los resultados de los registros realizados bajo el protocolo de aplicación de pulsos de 10 mv. para llevar el potencial de membrana a diferentes niveles (de -80 a +50mV), sirvieron para realizar una curva I-V. en la cual se promediaron los valores de corriente máxima de 7 células registradas bajo condiciones control y con IFN- $\alpha$ . La curva I-V (Fig 13) muestra los resultados promediados de la corriente máxima obtenidos a partir de los experimentos en presencia y ausencia de la citokina

Se observa en esta curva que la administración de 12500 UI de IFN- $\alpha$  provocaron una disminución significativa de aproximadamente el 35% ( $p < 0.05$ ) de la densidad de corriente máxima (pA/pF) con respecto a la situación control. este efecto se observó en casi todos los valores de potencial de membrana. Además, la citokina provocó un desplazamiento de la corriente máxima desde 0 mV hacia el valor de +10 mV. en esta curva también se observa que la activación de corriente en presencia del IFN $\alpha$  se inicia desde valores aún más negativos (-60 mV), haciéndose más evidente a -30mV

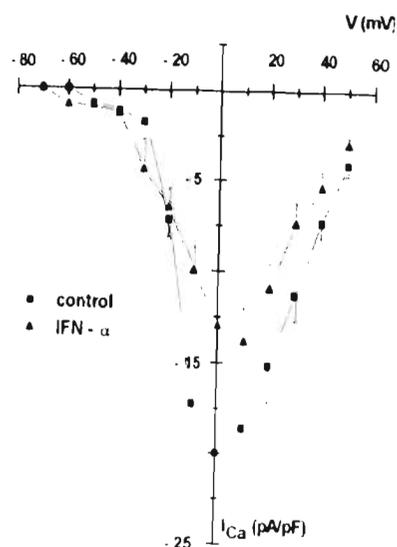
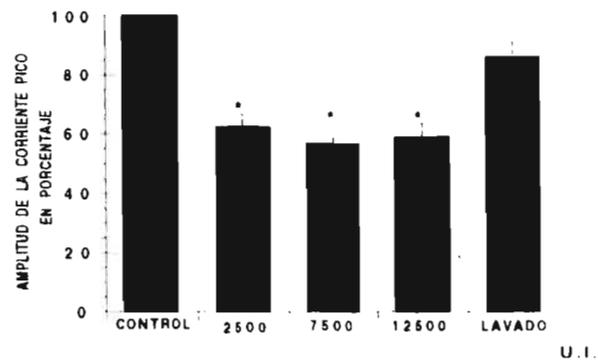


FIG: 13.- El efecto del IFN- $\alpha$  sobre la densidad de corriente de Ca<sup>2+</sup>. Los cuadros representan la densidad de corriente registrada en la situación control; mientras que los triángulos corresponden al valor, en presencia de la citokina. ( $p < 0.05$ ).



**FIG. 14.- Efectos del IFN- $\alpha$  a diferentes concentraciones, sobre la amplitud de la corriente pico. \* $p < 0.05$**

La disminución de la corriente de calcio por la aplicación del IFN- $\alpha$  se manifestó con las tres concentraciones administradas. Tanto la cinética como la intensidad del efecto observado fueron muy similares con las tres concentraciones empleadas. La figura 14 muestra que la corriente pico registrada en todos los casos se reduce por la aplicación del IFN- $\alpha$ . Las corrientes máximas se redujeron en  $62.46 \pm 1.12$ ,  $56.97 \pm 6.3$  y  $59.08 \pm 1.42$  % con 2500, 7500 y 12500 UI de la citokina respectivamente. Estos valores cuando se compararon con el control fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) sin embargo al entre sí no fueron diferentes, lo que sugiere un efecto muy similar no dependiente de la concentración. Una vez lavado el tejido se observa sólo una recuperación parcial de la corriente, la cual no es diferente estadísticamente al control ( $p > 0.05$ ).

Además de la disminución en la amplitud de las corrientes de calcio dependientes de voltaje, en las células hipocampales registradas en presencia del IFN- $\alpha$ , también se observó un cambio en la cinética de la corriente. El análisis de los procesos cinéticos de activación, inactivación y deactivación, mostraron que la citokina modificó uno de estos parámetros. El cálculo de la constante de tiempo ( $\tau$ ) se obtuvo, mediante el ajuste exponencial de las corrientes registradas a valores de potencial desde -10mV hasta +30 mV.

En el caso del proceso de activación la curva se ajustó a una exponencial de 1er orden ( $f = A1 * \exp \{-(t - K) / \tau\} + C$ ), en la cual el rango promedio de  $\tau$ , para 5 células registradas tanto del grupo control como células tratadas con IFN- $\alpha$  fue de 0.6 a 1.56 y de 0.3 a 1.6 msec respectivamente (Fig 15). Los resultados indican que la citokina independientemente de la concentración administrada, no modificó significativamente ( $p=0.9$ ) la cinética de activación de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje cuando se compara con los controles.

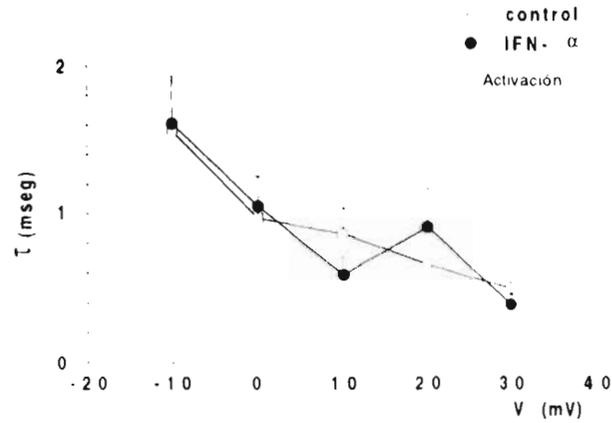
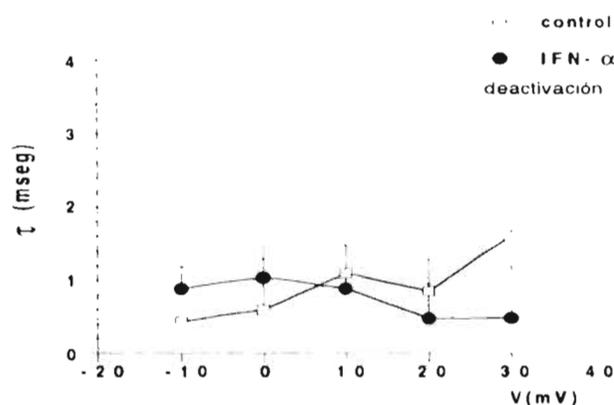


FIG.15.- Relación entre el valor de voltaje de la membrana y la constante de tiempo, durante el proceso de activación de los canales, en registros de fijación de voltaje, configuración célula completa. Los cuadros blancos muestran la situación control y los círculos rellenos, la aplicación de la citokina.

Las corrientes de cola se ajustaron a una exponencial también de primer orden, para valorar el efecto del IFN- $\alpha$  sobre el proceso de deactivación de los canales. De esta manera, el valor de  $\tau$  (0.4 a 1.6 mseg), obtenida en 5 células bajo condiciones control y con la citokina (0.4 a 1.04 mseg) (Fig. 16), no fueron significativamente diferentes ( $p = 0.3$ ).



**FIG.16.- Los valores promedio de la constante de tiempo,  $\tau$ , para 5 células en el proceso de deactivación del canal no se modificaron en presencia del IFN- $\alpha$ .**

El análisis de la inactivación de las corrientes de calcio registradas en condiciones control y con IFN- $\alpha$ , mostró que la curva se ajustó a una exponencial de 2do orden ( $f = A1 * \exp \{-(t - K) / \tau 1\} + A2 * \exp \{-(t - K) / \tau 2\} + C$ ), con lo cual se obtuvieron dos valores de  $\tau$ . En donde  $\tau 1$  corresponde a la parte de inactivación rápida del canal y  $\tau 2$  al de inactivación lenta del mismo. Los valores promedio de  $\tau 2$  en condiciones control estuvieron en el rango de 41 a 55 mseg, en cambio con IFN- $\alpha$  fueron desde 23 a 40 mseg. Así, la presencia de cualquier concentración de IFN- $\alpha$ , disminuyó el tiempo de inactivación lenta del canal de manera significativa ( $p=0.002$ ), provocando que ésta se volviera más rápida al modificar el valor de  $\tau 2$  (Fig. 17 B). En cambio la citokina no tuvo efecto sobre el proceso de inactivación rápida ( $\tau 1$ ) (Fig. 17 A).

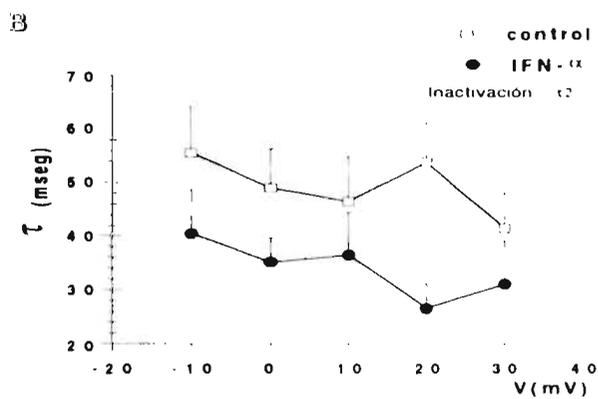
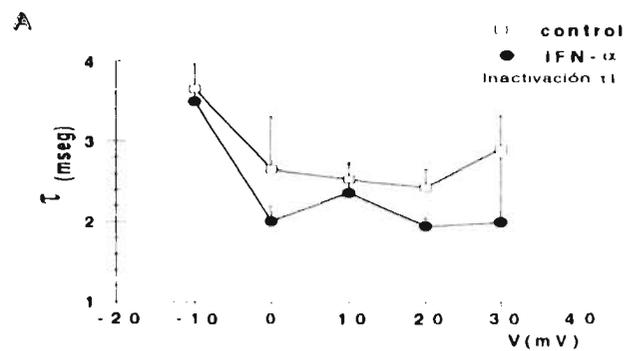


FIG.17.- La gráfica A muestra los resultados obtenidos al calcular el valor de  $\tau_1$ , el cual no fue estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ) a diferentes valores de voltaje de la membrana. En cambio en la gráfica B se observa como el IFN- $\alpha$ , disminuye el valor de  $\tau_2$  cuando se compara con la situación control.

Para ejemplificar el proceso de inactivación del canal de calcio, en la figura 18 se muestra un trazo de corriente, en ausencia y presencia de 7500 UI de la citokina, a un valor de potencial de membrana de +10mV. La normalización de las curvas mediante la ecuación exponencial de segundo orden ( $f = A1 * \exp \{-(t - K) / \tau1\} + A2 * \exp \{-(t - K) / \tau2\} + C$ ), permitió calcular los valores de  $\tau$ . Con la administración de IFN- $\alpha$  a una concentración de 12500 UI, se obtuvo un valor de  $\tau1 = 5.17$  msec y  $\tau2 = 44.04$  msec, en cambio en ausencia de la citokina los valores fueron de 4.85 y 73.34 msec para  $\tau1$  y  $\tau2$  respectivamente, que corresponde a los datos del promedio de 5 células.

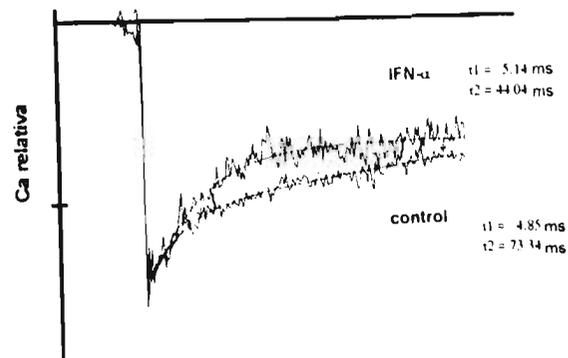
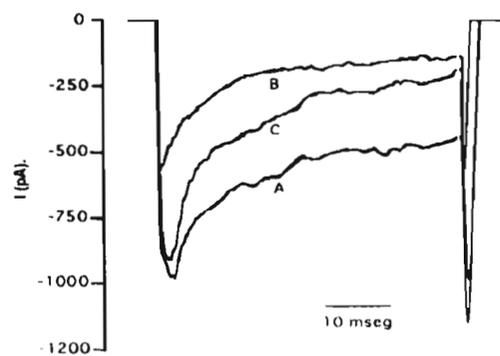


FIG. 18. Trazos de corriente de Ca<sup>2+</sup>, a un valor de voltaje de membrana de +10mV. Se observa el proceso de inactivación del canal en ausencia (control) y presencia de 7500 UI de IFN- $\alpha$ .

Los efectos depresores de la corriente de calcio inducidas por el IFN- $\alpha$ , también se manifestaron en los experimentos de curso temporal. La figura 19 muestra que la administración de una concentración de 7500 UI de IFN- $\alpha$ , reduce la corriente máxima, de un valor inicial de 983 pA hasta 508 pA, lo cual corresponde a una reducción de aproximadamente 48% de la corriente en condiciones control. Después de lavar la preparación y con ello eliminar la citokina del medio de perfusión, la corriente alcanzó un valor de 895 pA (trazo C de la figura 19) Este valor es aproximadamente el 91% de la corriente control por lo que hubo una recuperación parcial de la misma, efecto observado también, en los registros I-V.



**FIG. 19.- Registro de corriente entrante de Ca<sup>2+</sup>, obtenidos con un pulso de la misma intensidad. A: control, B: aplicación de IFN- $\alpha$  y C: lavado de la citokina del medio. La corriente no se recupera totalmente a su valor control después de la aplicación de la sustancia.**

La figura 20 resume los efectos del IFN- $\alpha$  en 15 células en las que se realizó el protocolo de curso temporal. En esta gráfica se observa que el efecto se inicia inmediatamente después de aplicada la citokina con dosis de 7500 y 12500 UI, mientras que la latencia es mayor cuando se administran 2500 UI. El efecto presenta sólo pequeños cambios menores al 10%, durante todo el tiempo de la aplicación. En estas condiciones la concentración de 12500 UI de IFN- $\alpha$  provocó un porcentaje de disminución de la corriente de Ca<sup>2+</sup> mayor que las otras 2 concentraciones. Una vez concluida la administración de la citokina, las corrientes tienden a recuperarse, aunque generalmente éstas no alcanzan el valor que mostraron antes de la aplicación de la citokina.

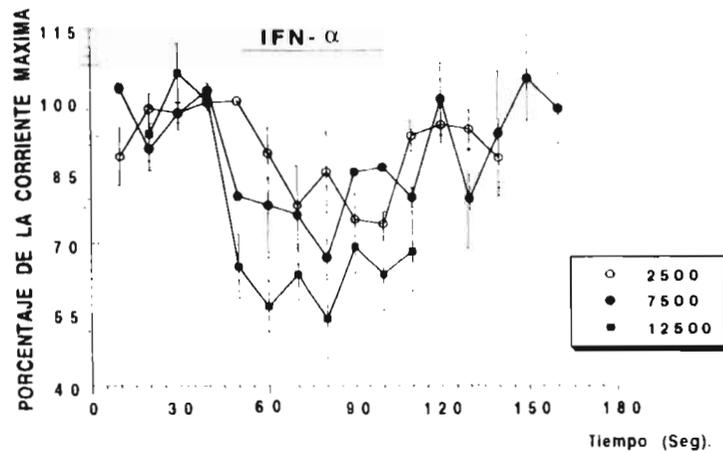


FIG. 20.- Registro de curso temporal. La administración de tres diferentes concentraciones de IFN- $\alpha$  redujeron en forma significativa ( $p < 0.001$ ), la corriente máxima, de una forma dependiente de la concentración.

Finalmente para determinar la especificidad de los efectos provocados por el IFN- $\alpha$  sobre las corrientes totales de calcio, se decidió realizar el mismo protocolo en células provenientes del ganglio cervical superior de rata. Los registros de fijación de voltaje en estas células mostraron que las corrientes registradas son mayores que las observadas en células piramidales hipocampales. La figura 21 es representativa de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  bajo condiciones control. durante un protocolo de pulsos que llevaron a la membrana a valores de potencial desde -80 a +50 mV

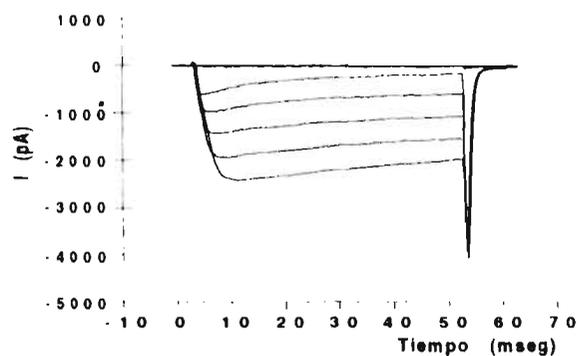


FIG. 21.- Las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  registradas en células provenientes del ganglio cervical superior mostraron amplitudes mucho mayores que las registradas en células hipocampales. En este registro se observan las corrientes inducidas por la aplicación de pulsos de 10 mV que llevaron el potencial de membrana desde -80 hasta +50 mV.

La densidad de corriente ( $\mu\text{A}/\text{pF}$ ) máxima que se alcanzó en el registro de estas células fue de  $-19.97$ ; la cual se obtuvo cuando el potencial de membrana se llevó de un valor de fijación de voltaje de  $-80$  hasta  $0\text{mV}$  en condiciones control. La administración del IFN- $\alpha$  en concentraciones de  $2500$ ,  $7500$  o  $12.500$  a células del ganglio cervical superior, con edad de cultivo de  $3$  días, provocó sólo una pequeña disminución de la corriente de calcio ( $5.9 \pm 0.93\%$ ), datos que no fueron significativos ( $p > 0.05$ ). En la figura 22, se observa que la administración de  $12500$  UI de la citokina no provocó efectos sobre la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  al compararla con el grupo control.

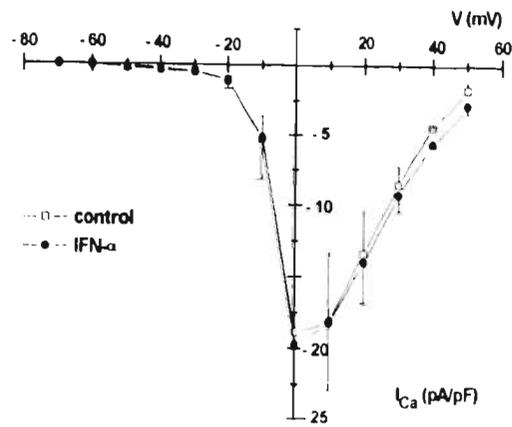
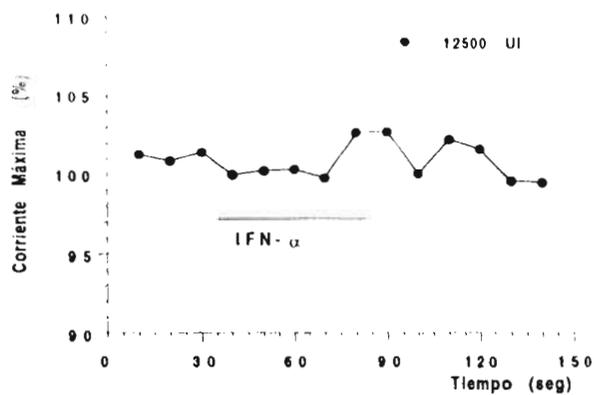


FIG. 22.- La administración de IFN- $\alpha$  a las células del ganglio cervical superior no provocó una reducción de la corriente de calcio.

Los registros que permitieron determinar el efecto del IFN- $\alpha$  durante un curso temporal (fig. 23) mostraron que la adición de una concentración de 12500 UI de la citokina sólo provocó una disminución ( $3 \pm 0.9\%$ ) estadísticamente no significativa ( $p=1.0$ ) sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$ .



**FIG. 23.-** La ausencia de un efecto sobre la corriente entrante de  $Ca^{2+}$  por parte del IFN- $\alpha$  sobre las células ganglionares, se manifestó también en los experimentos de curso temporal. En esta figura se muestra que la adición de una dosis de 12.500 UI de IFN- $\alpha$ , sólo indujeron un decremento de aproximadamente el 3%. Este efecto, el cual no fue estadísticamente significativo se revirtió una vez que se retiró la solución que contenía la citokina.

## DISCUSION.

Los resultados indican que el hipocampo es una estructura sensible al IFN- $\alpha$ . Tanto los registros extracelulares como los de fijación de voltaje muestran que todas las concentraciones de IFN- $\alpha$  empleadas en el presente trabajo ejercen acciones sobre algunos parámetros electrofisiológicos como la frecuencia de descarga y la actividad de canales iónicos de estas neuronas. En contraste cuando se emplearon células provenientes del ganglio cervical superior, los efectos observados con la concentración más alta fueron mínimos y no significativos.

En estudios previos, realizados con registros extracelulares, se demostró que la aplicación microiontoforética del IFN- $\alpha$  provoca un incremento en la frecuencia de descarga neuronal en el hipocampo, indicando que es una estructura sensible a esta citokina<sup>77</sup>. Dichos resultados concuerdan con los encontrados en el presente trabajo aún cuando las respuestas observadas hayan sido mixtas, es decir, el IFN- $\alpha$  no sólo provocó aumentos en la frecuencia de descarga celular también la disminuyó, lo cual fue dependiente de la concentración aplicada de la citokina.

Existen diferencias entre los resultados obtenidos en trabajos anteriores y el presente, probablemente debido a que reflejan la naturaleza de las distintas preparaciones utilizadas. En un estudio previo se utilizaron animales integros anestesiados y fijos en un aparato estereotáxico, mientras que el presente estudio se realizó en rebanadas de cerebro lo cual cualitativa y cuantitativamente representa modificaciones importantes en la conectividad y asociación entre los diferentes grupo neuronales<sup>47</sup>. Otros estudios más recientes y realizados también con registros intracelulares muestran que esta<sup>25</sup> u otras citokinas<sup>72</sup> modifican la excitabilidad de las neuronas hipocámpales.

Es necesario mencionar además, que las concentraciones de IFN- $\alpha$  empleadas en el presente estudio, en el rango de pM, son fácilmente alcanzables en seres humanos sometidos a procesos inflamatorios degenerativos u oncológicos<sup>16,43</sup>, por lo que es posible que las modificaciones sobre la excitabilidad de neuronas hipocámpales ocurran durante estas condiciones patológicas.

El patrón de respuesta extracelular de las células hipocámpales a la administración de varias dosis de IFN- $\alpha$  fue sin embargo peculiar. Los efectos no siguieron una relación concentración - efecto; esto es, el incremento en la concentración no necesariamente provocó que un número mayor de células modificaran su actividad eléctrica. Aunque el efecto particular ejercido, es decir aumento o disminución, sí fue dependiente de la dosis.

En este sentido, la concentración a la cual un número mayor de células incrementó su frecuencia de descarga fue la de 750 UI; mientras que la concentración de 6000 UI provocó que un mayor número de células redujera su frecuencia de descarga. En términos generales podemos inferir que las concentraciones menores empleadas provocan que un mayor número de neuronas responda con un incremento en la frecuencia de descarga. Contrariamente, con el empleo de concentraciones mayores el efecto es una inhibición de la frecuencia de disparo celular. La concentración de 1500 UI fue la que afectó a un mayor número de células independientemente si éstas incrementaban o decrementaban su frecuencia de descarga.

La naturaleza de estos efectos sugiere una interacción entre el IFN- $\alpha$  y la membrana celular diferente a la que se observa con la mayoría de neurotransmisores y fármacos. En estos últimos, la interacción con su receptor puede predecirse por la aplicación de ecuaciones farmacométricas<sup>33</sup>.

El tiempo de latencia que ocurre entre la aplicación del IFN- $\alpha$  y el efecto observado es, en la mayoría de los casos, de aproximadamente 3 a 4 minutos; este efecto inmediato de la citokina sobre las neuronas, inicialmente tendería a excluir un fenómeno genómico en esta acción<sup>74</sup>. De otra manera, los efectos observados en este proyecto, se presentarían posiblemente con una latencia mucho mayor, o no se observarían. Tal apreciación es importante de señalar, debido básicamente a que todos los efectos descritos hasta ahora para el IFN- $\alpha$ , se llevan a cabo por mecanismos que involucran la participación de proteínas y vías de señalización intracelular que finalizan en la expresión de genes y síntesis de proteínas<sup>91</sup>. De hecho, anteriormente se describió que el receptor típico a esta citokina está asociado íntegramente a proteínas intracelulares que una vez activadas modifican la actividad genómica de la célula afectada<sup>50</sup>.

Los efectos mediatos del IFN- $\alpha$ , encontrados sobre las neuronas hipocampales sugieren entonces que son consecuencia de la asociación de esta molécula con alguna porción de la membrana celular, posiblemente diferente a los receptores típicos descritos para el IFN- $\alpha$ . Tal aseveración se sustenta en el hecho de que los receptores a la citokina, mediante los cuales llevan a cabo sus efectos no neurales, han mostrado ser específicos de especie y no presentan reacciones cruzadas<sup>96</sup>; mientras que los efectos a nivel neuronal de esta citokina en roedores, por ejemplo, pueden ser desencadenados por la aplicación de interferones provenientes de otras especies; por ejemplo, la mayor parte de los estudios electrofisiológicos en diferentes zonas del cerebro, realizados en ratas <sup>73,75</sup> o conejos<sup>48</sup> se ha empleado el IFN- $\alpha$  humano (por ser comercialmente más accesible).

A pesar de que existen controversias al respecto algunos autores describieron<sup>76</sup> que el IFN- $\alpha$  puede modificar el síndrome de abstinencia provocado por la administración de morfina, actuando posiblemente a través de mecanismos opioides. Mostrando efectos tanto de índole conductual<sup>24</sup>, bioquímico y farmacológico<sup>11</sup>, lo que sugiere una posible interacción de esta sustancia con un tipo específico y conocido de receptores.

Aunque en el caso del IFN- $\alpha$  no se ha determinado aún el tipo de receptor involucrado en sus efectos neurales, para otras citokinas sí, como es el caso de las interleucinas que, debido a sus amplios efectos sobre el sistema nervioso, se ha descrito en profundidad la interacción que realizan con diversos grupo celulares<sup>21</sup>. Algunos estudios indican que tal interacción es saturable, específica y de corta duración. Además, después de los efectos electrofisiológicos provocados por estas sustancias se presentan modificaciones genómicas que involucran la síntesis de proteínas responsables de algunos procesos de desarrollo y diferenciación celular<sup>26</sup>. Las acciones electrofisiológicas, pero no las inmunológicas, ejercidas por la IL-1, por ejemplo, pueden ser bloqueadas por antagonistas específicos con una cinética farmacológica característica<sup>4</sup> y los tratamientos enzimático o térmico de esta citokina producen la pérdida total de su actividad <sup>23</sup>.

Es posible que una acción similar ocurra en el caso del IFN- $\alpha$ , aunque aún se desconocen los detalles de tal mecanismo de acción <sup>67</sup>, así como los procesos de señalización intracelular responsables de los efectos electrofisiológicos provocados por esta citokina. A este respecto en el presente trabajo se observó que esta sustancia modificó de manera importante la frecuencia de descarga neuronal casi inmediatamente después de su

administración a la rebanada hipocampal, lo cual indica que existe una relación a nivel de membrana del IFN- $\alpha$ . Esta interacción con la membrana podría estar modificando algunos de los procesos a nivel intracelular, como se ha descrito en otros experimentos en los que se ha observado que esta citokina es capaz de modificar la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos en células cultivadas <sup>92</sup>.

Los efectos sobre la excitabilidad neuronal descritos para el IFN- $\alpha$  pueden ser consecuencia de una acción de la citokina sobre alguno de los parámetros iónicos responsables de tal actividad celular. Por esta razón se decidió investigar si esta citokina modifica de alguna manera a las corrientes iónicas de calcio, empleando la técnica de fijación de voltaje en porciones de membrana.

Los resultados encontrados demuestran que el IFN- $\alpha$  reduce la corriente entrante de calcio de neuronas hipocampales cultivadas. Esto es importante debido al papel que los canales de calcio juegan en la regulación de diversas funciones celulares, como la excitabilidad membranal, la transmisión sináptica, los procesos de secreción y desarrollo celular <sup>60</sup>.

Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos para otra citokina como la interleucina 1 $\beta$  en neuronas hipocampales de la región CA1 <sup>72</sup>. En estos experimentos, la citokina redujo la corriente máxima y tardía entrante de Ca<sup>2+</sup> de una manera relativamente dependiente de la concentración, esto se observó después de 30 seg de aplicada la citokina al baño de tejido, en aproximadamente un 31.3 %, lo cual ocurrió a concentraciones de 7.9, 15.8 y 31.2  $\mu\text{g} / 10\mu\text{l}$ . Dosis más elevadas de la citokina no indujeron un porcentaje mayor de disminución de la corriente. De la misma manera que el IFN- $\alpha$  en el presente estudio, los efectos encontrados con la interleucina-1 $\beta$ , no fueron completamente reversibles, es decir después de retirar la citokina del medio el efecto depresor se observó durante todo el resto de la sesión de registro <sup>72</sup>. Todos los efectos de la interleucina-1 $\beta$  fueron bloqueados o prevenidos por la aplicación de un antagonista de los receptores a esta citokina. Estos datos sugieren una interacción directa y específica de esta citokina (un péptido de 153 aminoácidos) con un sitio receptor o posiblemente con la proteína canal <sup>72</sup>. Sin embargo, al igual que lo observado con el IFN- $\alpha$ , la irreversibilidad de los efectos y la aparente carencia de una relación concentración - efecto, sugieren una interacción diferente a las clásicamente descritas.

Hasta ahora se han descrito 6 tipos de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (L, N, P, Q, R y T), los cuales difieren en sus propiedades funcionales tales como la cinética de dependencia al tiempo y voltaje, la conductancia de cada canal y su farmacología<sup>60</sup>. Por lo tanto, el bloqueo parcialmente reversible que se observó en la corriente total entrante de Calcio en el presente estudio, podría ser explicado por efectos mediados por canales de activación por voltajes elevados del tipo L, N o P. Se realizó un análisis electrofisiológico para dilucidar el posible canal de calcio afectado por el IFN- $\alpha$  en las células hipocampales registradas.

Primero, los resultados indican que la corriente entrante de calcio es bloqueada parcialmente en presencia del IFN- $\alpha$ , es decir se observó una disminución en su amplitud de aproximadamente un 35%, con respecto a la situación control. El bloqueo de la corriente puede deberse principalmente, a que los canales de calcio dependientes de altos voltajes están siendo afectados, descartándose la posibilidad de un bloqueo sobre canales dependientes de bajos voltajes, debido a que estos canales se inactivan rápidamente a voltajes negativos que van desde -100 a -60 mV. Estas características permiten aislarlos cuando la célula es mantenida a potenciales de membrana depolarizantes<sup>38</sup>, observándose sólo los activados por altos voltajes. De esta manera al valor de potencial de voltaje de la membrana de las células hipocales registradas (-80 mV) la mayoría de éstos canales estaban inactivos.

A pesar de que no se observa un bloqueo de canales activados a bajos voltajes en presencia del IFN- $\alpha$ , la curva I-V (Fig. 13) muestra que hay un desplazamiento en la activación de estos canales. La parte de la curva que representa estas corriente de calcio, se encuentra desplazada a valores de voltaje más negativos que la situación control (-60mV en las células tratadas con la citokina y -50 mV en su ausencia). La corriente a través de éstos canales es mayor a un voltaje de membrana de -30mV, al compararse con el control en el cual a este valor de potencial la corriente de calcio es menor que con el IFN- $\alpha$ .

El promedio de la corriente de calcio máxima en la situación control se observa a un valor de 0mV, en cambio en presencia del IFN- $\alpha$ , esta corriente máxima se corrió hacia un valor de +10mV, esto sugiere que la citokina puede inducir corrientes que se activan a bajos voltajes o que cambia la dependencia de voltaje de canales activados a altos voltajes.

El análisis de la cinética de activación, inactivación y deactivación del canal, muestra que estos procesos siguen un curso temporal exponencial o doble- exponencial, dependiendo del o los canales de calcio presentes<sup>38</sup>. En el presente trabajo, al examinar tales procesos, en las células disociadas de hipocampo, en ausencia y presencia de IFN- $\alpha$ , se encontró que tanto la cinética de activación como la de deactivación se ajustan a una sólo exponencial y que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), de estos parámetros entre células en situación control y las tratadas con IFN- $\alpha$ .

La cinética de inactivación de canales de calcio en estas células se ajustó a un curso temporal de doble exponencial, lo que arrojó como resultado dos valores de  $\tau$ , en donde  $\tau_1$  indica el proceso de inactivación rápida del canal y  $\tau_2$  el de inactivación lenta. Cuando se hizo el análisis de las curvas de inactivación, los resultados indicaron que el IFN- $\alpha$  disminuyó el curso temporal del proceso de inactivación lenta, es decir  $\tau_2$ , el cual fue de 73.34 mseg para la situación control y 44.04 mseg para el tratamiento con la citokina. Esto indica que la citokina hace más rápido el proceso de inactivación del canal, es decir, esta sustancia bloquea principalmente aquellos canales de calcio dependientes de voltaje, que poseen una inactivación lenta de la corriente de calcio; por lo tanto permanecen los canales cuya cinética de inactivación es más rápida. En este sentido los canales que poseen una inactivación lenta son los canales dependientes de altos voltajes tipo "L", por lo que se asume que estos son los canales que pueden estar afectados por el IFN- $\alpha$ .

Los canales de calcio tipo L, son activados por altos voltajes, con una tasa de decaimiento muy lenta, son sensibles a dihidropiridinas y muestran una conductancia de 22 a 27 pS. Desde un punto de vista de localización estos canales se encuentran en virtualmente todos los tejidos excitables y en muchas de las células no excitables. Además, funcionalmente estos canales desencadenan el acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético, en el corazón y músculo liso, y controlan la liberación de algunas hormonas y neurotransmisores de las células endocrinas y en algunos tipos de neuronas<sup>2</sup>.

Además los canales de calcio tipo L, están involucrados de manera importante sobre la regulación de algunas acciones de la morfina sobre el organismo, lo que implica una modulación de estos canales sobre mecanismos opioides. Por ejemplo, fármacos de la familia de las dihidropiridinas, que bloquean la entrada de calcio a través de canales L,

disminuyen los efectos provocados por la naloxona en ratas dependientes de opioides.

Como consecuencia de las acciones de la naloxona, en estas ratas, se observó un incremento en los niveles de Dopamina en algunas áreas cerebrales, como sistema límbico y estriatum, efectos bloqueados por diltiazem; además esta sustancia inhibió la actividad de la proteína cinasa C en la región del puente medular<sup>93</sup>. La administración de bloqueadores de canales de calcio tipo L, por sí solos, no tienen efectos antinociceptivos, pero, son capaces de potenciar la acción antinociceptiva de la morfina aplicada intratecalmente <sup>8</sup>.

Se ha sugerido que la acción de nimodipina, para inhibir los efectos de retiro o síndrome de abstinencia producidos por la naloxona, se lleva a cabo mediante un mecanismo a nivel noradrenérgico; como lo sugieren experimentos en ratas anestesiadas, en las que se hicieron registros de actividad unitaria. La administración de 10mg/kg de nimodipina en estas ratas, disminuye la activación eléctrica de neuronas del locus coeruleus y suprime el síndrome de abstinencia, producido por la naloxona en ratas dependientes a morfina <sup>49</sup>. Desde este punto de vista una acción del IFN- $\alpha$  sobre estos canales, explicaría por ejemplo, los efectos de esta citokina sobre la liberación de algunos neurotransmisores, como es el caso de la noradrenalina, en varias regiones cerebrales <sup>46</sup> y en el corazón aislado<sup>10</sup>, o como ocurre con otras citokinas y otros neurotransmisores <sup>59</sup>.

En este sentido, cuando las concentraciones de IFN- $\alpha$  se incrementan en condiciones patológicas, como consecuencia se observan efectos secundarios a nivel de sistema nervioso central, además de cambios metabólicos y endocrinos. La administración de esta citokina induce en los pacientes un incremento en las concentraciones plasmáticas de noradrenalina, adrenalina, cortisol, glucagon, ácidos grasos libres y glucosa <sup>46,18</sup>. Cuando la aplicación crónica de IFN- $\alpha$ , produce una disminución del contenido plasmático de dopamina <sup>87</sup>. Esto indica la comunicación funcional que el sistema inmune establece con los sistemas endocrino y nervioso mediante la activación de sus mediadores químicos.

Otros estudios al respecto, señalan que la administración sistémica o intracerebroventricular de IFN- $\alpha$  recombinante humano y otros interferones híbridos, inhiben la secreción hipotálamo-pituitaria-adrenocortical, efecto que es antagonizado por naloxona y naloxonazina (antagonistas a receptores opioides-  $\mu$ ). A este nivel, la disminución de corticosterona inducida por la administración de 1000 y 10 000 UI de IFN- $\alpha$  recombinante, se correlaciona con un decremento en la actividad eléctrica de la mayoría de

las neuronas del núcleo paraventricular hipotálamico, en ratas anestesiadas, además de un incremento en la sincronización electroencefalográfica (EEG) registrada a nivel cortical **9,84**.

Al igual que el IFN- $\alpha$ , el verapamil y la nimodipina, provocan una disminución de las concentraciones plasmáticas de corticosterona en ratas, además de un aumento en los niveles de noradrenalina y disminución de dopamina, boqueando las acciones de la administración de morfina. Cuando se uso un agonista del canal de calcio tipo L, BAY K 8644, los efectos de la morfina a nivel endocrino se potenciaron **8,55**. Lo cual indica que la participación de los canales de calcio tipo L los cuales median el flujo de calcio, es necesaria para la expresión de la acción de los opioides en el sistema hipotálamo-hipófisis- adrenales. Esto sugiere que el IFN- $\alpha$  pueda estar ejerciendo sus efectos a través de receptores opioides también en las neuronas hipocampales **55**.

El IFN- $\alpha$  también bloquea la potenciación a largo plazo en células de rebanadas hipocampales, efecto que es consistente con una disminución de la corriente de calcio de neuronas en cultivo de la región hipocampal<sup>25</sup>, en otro experimento realizado en rebanadas de hipocampo de rata en la región CA1, un tipo de potenciación a largo plazo que es mediada a través de canales de calcio dependientes de voltaje, fue bloqueada por nifedipina, genisteina y lavedustina A, estos dos últimos inhibidores de cinasas de la tirosina **19**, lo cual sugiere que la potenciación a largo plazo inducida a través de canales de calcio dependientes de voltaje, primero esta regulada por canales tipo L y segundo requiere de la activación de proteínas cinasas capaces de fosforilar residuos de tirosina, por lo que indicaría que esta citokina pudiera estar ejecutando sus acciones a este nivel.

Es probable que el IFN- $\alpha$ , este bloqueando los canales de calcio por un mecanismo similar a como lo hacen los antagonistas típicos, aun cuando su relación fármaco - receptor sea diferente. Esto significa que el bloqueo de la potenciación a largo plazo, así como la liberación de péptidos transmisores, como las catecolaminas, y la disminución de hormonas esteroides como la corticosterona por acción de la citokina, sea un mecanismo mediado por cinasas de la tirosina. Lo cual parecería lógico si se asume que el mecanismo que llevan a cabo los interferones para producir sus efectos inmunológicos esta dado por la fosforilación del receptor a nivel intracelular por cinasas de la tirosina de la familia Janus.

Si el IFN- $\alpha$  esta provocando sus efectos a nivel del cerebro, por actuar sobre receptores del sistema opioide, específicamente sobre los receptores  $\mu$ , también podría estar modificando alguna vía de señalización que involucra a este sistema. Como en el caso de la activación de fosfolipasa C, cuando el receptor opioide -  $\mu$  es ocupado en células provenientes de una línea celular de neuroblastoma humano <sup>88</sup>, si en estas células se aplica nifedipina, se produce una inhibición dependiente de la dosis en la formación de trifosfato de inositol (IP3), demostrando que a la activación del receptor  $\mu$ , sigue un influjo de calcio a través de canales de calcio tipo L, que activan una fosfolipasa C.

Estos datos proporcionan una idea de que los mecanismos que sigue el IFN- $\alpha$  para provocar algunos de sus efectos, se llevan a cabo a través de la activación de sistemas opioides y de diferentes vías o cascadas de señalización intracelular. Pero, aún queda por determinar cual mecanismo y que vía de señalización específica esta involucrada en cada una de las diferentes acciones que ejerce el IFN- $\alpha$  a nivel neural, y si estos efectos los ejerce de una manera indirecta o a través de un receptor no identificado para la citokina.

El siguiente paso es comprobar de manera farmacológica si el IFN- $\alpha$  esta bloqueando canales de calcio tipo L o si existe la posibilidad de un bloqueo inespecifico que afecte a otros canales dependientes de altos voltajes, lo cual no puede descartarse si se toma en cuenta que tanto los canales N como los P y Q participan en eventos importantes en la dinámica celular del sistema nervioso central, y que por lo tanto podrian estar involucrados de alguna manera en los efectos que la citokina ejerce a este nivel.

Por ejemplo los canales tipo N son también activados por voltajes altos, pero difieren farmacológicamente de los canales tipo L porque no son bloqueados por las dihidropiridinas, sino que son bloqueados por la  $\omega$ -conotoxina. Estos canales a menudo muestran una conductancia menor que los tipo L, y tienden a inactivarse con potenciales depolarizantes sostenidos. Los canales tipo N estan restringidos principalmente a neuronas y están involucrados tanto en la liberación de neurotransmisores, como en el crecimiento y diferenciación celular <sup>61</sup>. Los efectos del IFN- $\alpha$  sobre la diferenciación y el crecimiento celular ejercidos en diferentes modelos celulares <sup>69,92</sup>, pueden ser sustentados por una acción a través de este tipo de canales de Ca<sup>2+</sup>.

En el caso de los canales tipo P, los cuales aunque inicialmente fueron identificados en las células de Purkinje, se mostró que se localizan en una gran variedad de tipos neuronales incluyendo el hipocampo <sup>44</sup>. Estos canales, los cuales son activados por voltajes altos, son selectivamente bloqueados por  $\omega$ -agatoxina-IVA y son insensibles a las dihidropiridinas y a la  $\omega$ -conotoxina. Estos canales juegan un papel esencial en la inducción de la depresión de larga-duración <sup>62</sup>. También el IFN- $\alpha$  ejerce efectos sobre mecanismos plásticos de larga duración como la potenciación posttetánica de corta y larga duración <sup>26</sup>, por lo que existe la posibilidad de una acción sobre este tipo de canales de calcio.

Tampoco se descarta la posibilidad de una modulación sobre los canales activados por bajos voltajes, T, ya que en el presente trabajo se observó como el IFN- $\alpha$  induce la aparición de pequeñas corrientes a niveles de voltaje en los que se supone hay una inactivación de estos canales. El IFN- $\alpha$ , además de disminuir las corrientes entrantes de Ca<sup>2+</sup>, corrió la curva corriente - voltaje hacia valores más positivos (+10 mV) e indujo una activación de los canales a valores más negativos, que las corrientes registradas en ausencia de la citokina. Lo cual sugiere que, probablemente el IFN- $\alpha$  este activando corrientes IVA o que este modificando la dependencia de voltaje para la activación de los canales IVA.

Los canales de calcio tipo T, son canales activados por voltajes bajos y son llamados rápidos debido a que se inactivan rápidamente. Estos canales son sensibles al ion Ni<sup>2+</sup>, al amilorida y al octanol, y son resistentes a las dihidropiridinas y a la  $\omega$ -conotoxina. Este tipo de canales de calcio muestran una conductancia de aproximadamente 8 pS, y han sido implicados en las descargas repetitivas de la actividad de marcador de paso que muestran algunas células cardíacas y algunas neuronas <sup>34</sup>. Desde 1979, Calvet y Greaser mostraron que el IFN- $\alpha$  modifica la actividad de las células marcapaso de rebandas de corteza cerebral de gato <sup>17</sup>, mientras que Blalock describió efectos de esta citokina sobre la frecuencia cardíaca, consecuencia de un efecto sobre las células del nodo sinusal del corazón de la rata <sup>10</sup>. Estos hallazgos también sugieren una acción del IFN- $\alpha$  sobre este tipo de canales de Calcio.

Entonces, si se requiere elucidar los mecanismos subyacentes a las diversas funciones celulares, será indispensable describir con exactitud el tipo de canal involucrado en estas acciones. Varios estudios muestran que la clasificación y funcionalidad de estos canales es más complicada que lo descrito previamente y que las propiedades funcionales

de los canales de Calcio de cierto tipo pueden variar mucho más de lo que previamente se consideró <sup>5</sup>.

Así, la continuación de este trabajo experimental consistirá en la descripción del efecto de varias neurotoxinas, específicamente  $\omega$ -conotoxina, dihidropiridinas,  $\omega$ -agatoxina-IVA con la finalidad de determinar el canal de  $Ca^{2+}$  afectado por la citokina, además de usar estrategias electrofisiológicas, para discriminar el canal o los canales sobre los cuales actúa la citokina.

## CONCLUSIONES.

- El IFN- $\alpha$  modifica la actividad eléctrica de las neuronas de la región CA1 del hipocampo, los cuales se manifiestan como cambios en la frecuencia de descarga neuronal. Este efecto, sobre la excitabilidad neuronal es consecuencia de una interacción de la membrana celular con la citokina, diferente a la relación descrita del IFN- $\alpha$  con sus receptores típicos

- La latencia de la respuesta de las células hipocampales a la aplicación del IFN- $\alpha$ , excluye que tal acción se lleve a cabo por mecanismos a nivel genómico.

- Los efectos del IFN- $\alpha$  sobre la actividad eléctrica de las neuronas hipocampales, se debe a una modulación sobre la excitabilidad celular, la cual involucra cambios en las conductancias iónicas. Los resultados indican que la citokina modifica parámetros eléctricos directamente por modificar la cinética del canal de calcio.

- El IFN- $\alpha$  modula las corrientes de  $Ca^{2+}$  presentes en la membrana de las neuronas hipocampales, de una forma característica que se traduce como una disminución de tales corrientes, con un corrimiento en la dependencia de voltaje de activación de los canales, hacia valores más negativos.

-Al modificar la cinética de inactivación lenta de la corriente de calcio, el IFN- $\alpha$  probablemente esté actuando sobre canales dependientes de altos voltajes tipo L.

- Los efectos del IFN- $\alpha$  observados a concentraciones dentro del rango fisiológico, indican que la citokina ejerce sus acciones a nivel de sistema nervioso central, no sólo en condiciones patológicas sino también en situaciones fisiológicas.

- Al parecer no todas las estructuras cerebrales son sensibles a la acción de la citokina, como en el caso de células cultivadas provenientes del ganglio cervical superior de rata, en las cuales el IFN- $\alpha$  no tuvo efecto a ninguna concentración aplicada

## REFERENCIAS

1. Abe, K.; Xie, F. and Saito, H. (1991). *Epidermal growth factor enhances short-term potentiation and facilitates induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices*. Brain Res. 547: 171-174.
2. Ahljianian, M.K.; Westenbroek, R.E. and Catteral. W.A. (1990) *Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain spinal- cord and retina*. Neuron 4:819-832.
3. Altman, A.; Coggshall, K.M. and Mustelin, T. (1990). *Molecular event mediating T cell activation*. Adv. Immunol. 48: 227- 231.
4. Arend, W.P. (1991). *Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the inteleukin 1 family*. J. Clin. Invest. 88:1445-1451.
5. Artalejo, C. R.; Perlman , R.L. and Fox, A. P. (1992).  *$\omega$ -conotoxin-GVIA blocks a  $Ca^{2+}$  current in bovine chromaffin cells that is not the "classic" N-type*. Neuron 8:85-95.
6. Benveniste, G.N. (1992) *Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function and mechanism of action*. Am. J. Physiol. 263 (Cell Physiol. 32). C1-C16.
7. Berkenbosch, F.; Van oers, J.; del Rey, A.; Tilders, F.; and Besedovsky, H. (1987). *Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1*. Science, 238:524-526.
8. Bernstein, M.A. and Welch, S.P. (1995). *Alterations in L-type calcium channels in the brain and spinal cord of acutely treated and morphine - tolerant mice*. 696(1-2): 83-88.
9. Birmanns, B.; Saphier, D. and Abramsky, O. (1990). *Alpha - Interferon modifies cortical EEG activity: dose - dependente and antagonism by naloxone*. J. Neurol. Sci. 100(1-2). 22 -26.
10. Blalock, J.E., and Stanton J.D. (1980). *Common pathways of interferon hormonal action*. Nature 283: 406-408.

11. Blalock J.E., and Smith, E.M. (1981). *Human Leukocyte interferon (HuIFN- $\alpha$ ): potent endorphin-like opioid activity.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101:472-478.
12. Bottenstein, J.E. and Sato, G. (eds.) 1985. *Cell culture in the Neurosciences.* Plenum Press. New York.
13. Branca, A.A., and Baglioni, C. (1981). *Evidence that types I and II interferons have different receptors.* *Nature.* 294: 768-770.
14. Branca, A.A.; Faltynek, C.R.; D'Alessandro, S.B., and Baglioni, C. (1982). *Interaction of interferon with cellular receptors. Internalization and degradation of cell-bound interferon.* *J. Biol. Chem.* 257:13291-13296.
15. Buchhalter, J.R. and Dichter, M.A. Neurons from *Neuromethods.* (1992). 23. *Practical Cell Culture Techniques.* Ed. by Alan A. Boulton, Glen B. Baker and Wolfgang Walz. Humana Press. pp 241-268.
16. Cacabelos, R.; Barquero, M.; Garcia, P.; Alvarez, X.A. and Deseijas, E.V. (1991). *Cerebrospinal Fluid interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in Alzheimer's disease and neurological disorders.* *Exp. Clin. Pharmacol.* 13:455-458.
17. Calvet, M.C. and Greeser, I. (1979). *Interferon enhances the excitability of culture neurons.* *Nature* 278: 558-560.
18. Cassmit, E.P.; Heijligenberg, R.; Endert, E.; Ackemans, M.T.; Saverwern, H.P. and Romijn, J.A. (1996). *Endocrine and metabolic effects of interferon - alpha in humans.* 81 (9): 3265 - 3269.
19. Cavus, I. and Teyler, T. (1996). *Two forms of long - term potentiation in area CA1 activate different signal transduction cascades.* *J. Neurophysiol.* 76(5): 3038 - 3047.
20. Chang, J.Y.; Martin, D.F. and Johnson, E.M. (1989). *Interferons can prevent sympathetic neuronal death induced by NGF deprivation.* *Soc. Neurosc. Abstr* 15:438-441
21. Chang, Y.; Albright, S. and Lee, F. (1994). *Cytokines in the central nervous system: expression interleukines and macrophage colony stimulating factor and its receptor during development.* *J. Neuroimmunol.* 52: 9-17
22. Cortes, J. M.D.; Hagop Kantarjian, M.D.; O'Brien, S.; Robertson, M.D.; Sherry

- Pierce, R.N. and Moshe Talpaz, M.D. (1996). *Results of interferon- Alpha Therapy in Patients with Chronic myelogenous Leukemia 60 years of age and older*. The American Journal of Medicine. 100:452-455
23. Culver, K.W. (1994). *Clinical applications of cytokine therapy for cancer*. Clin.Chem. 40: 510-512, 1994.
  24. Dafny, N. and Reyes-Vázquez, C. (1985). *Three different types of alpha interferons alter naloxone-induced abstinence in morphine-addicted rats*. Immunopharmacol. 9:13-17.
  25. D'Arcangelo, G.; Grass, F.; Ragozzino, D.; Santoni, A.; Tancredi, V. and Eusebi, F. (1991). *Interferon inhibits synaptic potentiation in rat hippocampus*. 564:245-248.
  26. Decker, T. (1997). *The molecular biology of type I interferons (interferon  $\alpha\beta$ )*. In: *Interferon therapy of multiple sclerosis*. Reder, A.T. (ed). pp. 41-76. Marcel Dekker Inc press. New York.
  27. Eife, R.; Hahn, T.; De Tavera, M.; Schertel, F. and Holtmann, H. (1981). *A comparison of the antiproliferative and antiviral activities of alpha-beta and gamma- interferons: Description of a unified assay for comparing both effects simultaneously*. J. Immunol. Methods. 47:339-347.
  28. Felten, D.L.; Felten, S.Y.; Carlson, S.L.; Olschowda, J.A. and Liunat, S. (1985). *Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue*. J. of Immunol. 135:7555-7655.
  29. Ferguson, I.A.; Schweitzer, J.B. and Johnson, E.M. Jr. (1990). *Basic fibroblasts growth Factor, receptor - mediated internalization, metabolism and anterograde axonal transport in retinal ganglion cells*. J. Neurosci. 10:2176-2189.
  30. Fischer, F.E. (1973). *Fundamental Statistical Concepts*. pp. 257-285. Canfield Press San Francisco, 1973.
  31. Fisher, P.B. and Grant, S. (1985). *Effects of interferon on differentiation of normal and tumor cells*. Pharmacol Ther. 27 (2): 143-166.
  32. Friesen, H.J.; Evinger, M.; Pestka, S. (1981). *Purification and molecular characterization of human fibroblast interferon*. Arch. Biochem. Biophys. 216:432-450.

33. Goodman, G.A. (1996). *The pharmacological basis of Pharmacology*. 9th ed. McGraw-Hill, ed.
34. Hagiwara, N.; Irisawa, H. and Kameyama, N. (1988). *Contribution of two types of calcium channels to the pacemaker potentials of rabbit sinoatrial node cells*. J. Physiol. 395: 233-252.
35. Hamill, O.P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981). *Improved Patch-Clamp Technique for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches*. Pflügers Arch 391:85-100.
36. Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957). *Virus interference I: the interferon*. Proc. Roy. Soc. Lond. 147:258-267.
37. Heremans, H. and Billiau, A. (1989). *The potential role of interferons and interferon antagonist in inflammatory disease*. Drugs. 38 (6):957-972.
38. Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Second ed. Sinauer Associates Inc.
39. Hoffman, F.M.; Vonhanuher, R.; Dinarello, C.; Mizel, S.; Hinton, D. and Merrill J.E. (1986) *Immunoregulatory molecules and IL-2 receptors identified in multiple sclerosis brain*. J. Immunol. 137:3239-3245.
40. Hoffman, F.M.; Hinton, D.R.; Johnson, K. and Merrill J.E. (1989) *Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain*. J. Exp. Med. 170: 607-612.
41. Howard, M.J.; Fuller, W. B.; Brian, E.S and Jorpe, M.A. (1994) *How Interferons Fight Disease*. Sci. American. 270 (5):40-47
42. Ihle, J.N. (1995). *The Janus Protein Tyrosin Kinase Family and Its Role in Cytokine Signaling*. Advances in Immunol. 60 1-35.
43. Jacobs, R.F. and Tabor, D.R. *The immunology of sepsis and meningitis-cytokine biology*. J. Infect. Dis. 73:7-15. 1990.
44. Johnston, D.; Fisher, R. and Gray, R. (1992). *Voltage-gated calcium channels in adult hippocampal neurons* Ion Channels 3. 39-62.
45. Jones, R.S.G. and Heinemann, U (1988) *Synaptic and intrinsic responses of medial entorhinal cortical cells in normal and magnesium free-medium in vitro*. J. Neurophysiol. 59: 1476-1496

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

46. Kabiersch, A.; del Rey, A.; Honegger, C.G. and Besedovsky, H.O. (1988) *Interferon-alpha induces changes in norepinephrine metabolism in the rat brain*. Brain Behav Immun. 2: 267-274.
47. Kerkut, G.A. and Wheal, H.V. (1981). *Electrophysiology of isolated mammalian CNS preparations*. Kerkut, G.A and Wheal, H.V (Eds). Academic press. New York. Pp. 1-153.
48. Kimura-Takouchi, M.; Majde, J.A.; Toth, L.A. and Krueger, J.M. (1992). *Influenza virus-induced changes in rabbit sleep and acute phase responses*. Am J Physiol. 263: R1115-R1121.
49. Krystal, J.H.; Compere, S.; Nestler, E.J. and Rasmussen, K. (1996) *Nomodipine reduction of naltrexone-precipitated locus coeruleus activation and abstinence behavior in morphine-dependent rats*. Physiol. Behav. 59 (4-5): 863-866
50. Langer, J. and Pestka S. *Interferon receptors* (1988). Immunol. 9:875-878.
51. LeMay, L.G.; Vander, A.J. and Kluger, M.J. (1990). *Role of interleukin 6 in fever in rats*. Am. J. Physiol. 258(3): R798-R803.
52. Lindholm, D.; Castrén, E.; Hengerer, B.; Zafra, F.; Berninger, B. B. And Thoenen, H. (1992). *Differential regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in neurons and astrocytes by glucocorticoid hormones*. Eur. J. Neurosci. 4:404-410.
53. Llinás, R.; Sugimori, M.; Hillman, D.E. and Cherksey, B. (1992). *Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in the mammalian central nervous system*. TINS. 15 (9):351-355
54. Malipiero, U.V.; Frei, K. and Fontana A. (1990). *Production of hemopoietic colony-stimulating factors by astrocytes*. J. Immunol. 144: 3816-3821
55. Martínez - Pinero, M.G.; Vargas, M.L. and Milanes, M.V. (1993) *L-Type Ca<sup>2+</sup> ligands modulate morphine effects on the hypothalamus - pituitary - adrenocortical axis in rats*. Eur. J. Pharmacol. 232 (2-3) 191-198.
56. McNemar, Q. (1969) *Psychological Statistics* Pp 54-58. Wiley. New York
57. Mermelstein, P.G. and Surmeier, D.J. (1997) *A calcium channel reversibly blocked by ω-conotoxin GVIA lacking the class D α1 subunit*. Neuroreport. 8 485 - 489.
58. Meyers, C.A.; Scheibel, R.S. and Forman, A.D. (1991). *Persistent neurotoxicity of*

- systemically administered interferon-alpha*. *Neurology*. 41:672-676.
59. Miller, L.G.; Galpern, W.R.; Dunlap, K.; Dinarello, C.A. and Turner, T.J. (1990). *Interleukine 1 augments  $\gamma$ -amino butyric acidA receptor function in brain*. *Mol. Pharmacol*. 39:105-108.
  60. Miller, R.J. (1987) *Multiple calcium channels and neuronal function*. *Science* 235: 46-52.
  61. Miller, R.J. (1992). *Voltage sensitive  $Ca^{2+}$  channels*. *J. Biol. Chem.* 267: 1403-1406
  62. Mintz, I.M.; Adams, M.E. and Bean, B.P. (1992). *P-type calcium channels in central and peripheral neurons*. *Neuron* 9:85-95.
  63. Morrow, Lee, E.; McClellan, J.L.; Conn, C. A. and Kluger, M.J. (1993). *Glucocorticoids alter fever and IL-6 responses to psychological stress and to lipopolysaccharide*. *The American Physiological Society* R1010-R1016.
  64. Nakamori, T.; Morimoto, A.; Yamaguchi, K.; Watanabe, T. and Long, N.C. (1993) *Organum Vasculosum laminae terminalis (OVLT) is a brain site to produce interleukin-1 beta during fever*. *Brain Res.* 618: 155-159.
  65. Patterson, P.H. and Nawa, I. (1993). *Neuronal differentiation Factors/cytokines and synaptic plasticity*. *Cell*. 72: 123-137.
  66. Paxinos, G.; Watson, (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sydney
  67. Pellegrini, S. and Schindler, C. (1993). *Early events in signaling by interferons* *TIBS* 18:338-342
  68. Pestka, S., ed. (1981). *Methods Enzymol. Interferons*. Part A, vol. 79. New York: Academic 677 pp.
  69. Pestka, S. and Langer, J.A. (1987). *Interferons and their actions* *Ann. Rev. Biochem.* 56:727-777.
  70. Plata-Salamán, C.R. (1991). *Immunoregulators in the Nervous System*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 15:185-215.
  71. Plata-Salamán, C.R. (1992). *Interferons and central regulation of feeding* R1222-R1227
  72. Plata-Salamán, C.R. and French-Mullen, J.M.H. (1992) *Interleukin-1 $\beta$  depresses*

- calcium currents in CA1 hippocampal neurons at pathophysiological concentrations.* Brain Res. Bull. 29: 221-223.
73. Prieto-Gómez, B., Reyes-Vázquez, C. and Dafny, N. (1983). *Differential effects of interferon on ventromedial hypothalamus and dorsal hippocampus.* J. Neurosci. Res. 10: 273-278, 1983.
  74. Pober, J.S. and Cotran R.S. (1990). *Cytokines and cell biology.* Physiol. Rev. 70: 427-451.
  75. Reyes-Vázquez, C., Prieto-Gómez, B. and Dafny, N. (1982). *Novel effects of interferon on the brain: Microiontophoretic application and single cell recordings in the rat.* Neurosci. Lett. 34: 201-206.
  76. Reyes-Vázquez, C., Weisbrodt, N. and Dafny, N. (1984). *Does Interferon exert its action through opiate receptors?.* Life Sci. 35: 1015-1021.
  77. Reyes-Vázquez, C., Prieto-Gómez, B., Georgiades, J. A. and Dafny, N. (1984). *Alpha and Gamma interferon's effects on cortical and hippocampal neurons: Microiontophoretic application and single cell recording.* Intern. J. Neurosci. 25: 113-121.
  78. Reyes-Vázquez, C.; Prieto-Gómez, B. and Dafny, N. (1994). *Alpha-interferon suppresses food intake and Neuronal activity of the lateral hypothalamus.* Neuropharmacol. 33 (12): 1545-1552.
  79. Rivest, S. And Rivier, C. (1993). *Centrally injected interleukin-1 beta inhibits the hypothalamic LHRH secretion and circulating LH levels via prostaglandins in rats.* J. Neuroendocrinol. 5 (4): 445-450.
  80. Rothwell, N.J. (1991). *Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain.* Trends Pharmacol. Sci. 12(11): 430-436.
  81. Rothwell, N.J. and Hopkins, S. J. (1995). *Cytokines and the Nervous system II: actions and mechanisms of action.* Trends in Neurosci. 18:130-136
  82. Sánchez, M.P.; Tapley, P.; Saini, S.S.; Pulido, D. and Barbacid, M. (1994). *Multiple Tyrosine Protein Kinases in rat hippocampal Neurons: Isolation of Prk-3, a receptor expressed in proliferative zones of the developing brain.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 1819-1823.

83. Saphier, D.; Roering, S.C.; Ito, C.; Vlasak, W.R.; Farrar, G.E.; Broyles, J.E. and Welch, J.E. (1994). *Inhibition of neural and neuroendocrine activity by alpha-Interferon: neuroendocrine, electrophysiological and biochemical studies in the rat.* Brain. Behav. Immun. 8 (1): 37-56.
84. Saphier, D. (1995). *Neuroendocrine effects of interferon - alpha in the rat.* Adv. Exp Med Biol. 373: 209-218.
85. Sastry, B.R.; Chirwa, S.S.; May, P.B. Y. And Maretic, H (1988). *Substances released during tetanic stimulation of rabbit neocortex induce neurite growth in PC-12 cells and long- term potentiation in guinea pig hippocampus.* Neurosci. Lett. 91:101-105.
86. Saukkonen, K.; Sande, S.; Cioffe, C.; wolpe, S.; Sherry, B.; Cerami, A. and Tuomanen, E. (1990). *The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis.* J. Exp. Med. 171 (2):439-448
87. Shuto, H.; Kataoka, Y.; Horikawa, T.; Fujihara, N. and Oishi, R. (1997). *Repeated interferon - alpha administration inhibits dopaminergic neural activity in the mouse brain.* Brain Res. 747(2): 348-351.
88. Smart, D.; Smith, G. and Lambert, D.G. (1995). *Mu-opioids activate phospholipase C in SH-SY5Y human neuroblastoma cells via calcium-channel opening.* Biochem. J. 15: 305(pt 2): 577-581.
89. Stephen J. Hopkins and Nancy J. Rothwell. (1995). *Cytokines and the nervous system I: Expression and recognition.* Trends Neurosci. 18: 83-88.
90. Stöckli, K.A.; Lillien, L.E.; Nöher-Noë, M.; Breitfeld, G.; Hughes, R.A.; Raff, M.C., Thoenen, H. and Sendtner, M. (1991) *Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain.* J Cell Biol. 115:447-459.
91. Taga, T. and Kishimoto, T. (1992) *Cytokine receptors and signal transduction.* FASEB J. 6:3387-3396.
92. Tedeschi, B. (1992). *Interferon-a candidate mediator of cell growth.* Adv. Exp. Med Biol. 321:53-58. C. and Castagna, M. (1979) *Effect of interferon on concentration of cyclic nucleotides in cultured cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 3890-3896.

93. Tokuyama, S. and Ho I.K. (1996). *Effects of diltiazem, a Ca<sup>2+</sup> channel blocker, on naloxone- precipitated changes in dopamine and its metabolites in the brains of opioid - dependent rats.* Psychopharmacol. 125(2): 135-140.
94. Varadi, G.; Mori, Y.; Mikala, G. and Schwartz, A. (1995). *Molecular determinants of Ca<sup>2+</sup> Channel function and drug action.* TIPS. 16:43 - 49.
95. Waage, A.; Halstensen, A.; Shalaby, R.; Brandtzaeg, P.; (1989) *Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response.* J. Exp. Med 170 1859-1867
96. Yap, W.H.; Teo, T.S. and Tan, Y.H. (1996) *An early event in the interferon-induced transmembrane signaling process.* Science 234 355-358
97. Zhu, Y. and Ikeda, S.R. (1993). *Adenosine modulates voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in adult rat sympathetic neurons.* J. Neurophysiol. 70:610-620.
98. Zoon, K.C.; Arnheiter, H.; Zur Nedden, D.; Fitzgerald, D.J. P. and Willingham, M.C. (1983). *Human interferon alpha enters cells by receptor-mediated endocytosis.* Virology. 130(1): 195-203.