

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

**RECEPTORES DE INTERLEUCINA-1 EN EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL: ESTUDIO DE SU REGULACION EN RELACION CON
EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-ADRENAL Y EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE ESCLEROSIS MULTIPLE**

**Alberto LLedó Macau
Tesis Doctoral**

**Directores: Dra. Carmen Guaza Rodriguez
Dr. José Borrell Andrés**

**Instituto Cajal
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

Madrid, Septiembre 1994.

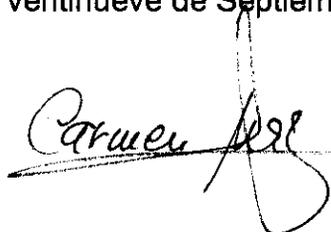
Dña. Carmen Guaza Rodríguez, Colaborador Científico del Instituto Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y D. José Borrell Andrés, Profesor de Investigación del Instituto Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICAN:

Que el licenciado D. Alberto LLedó Macau ha realizado bajo su dirección, los trabajos experimentales que han conducido a la elaboración de esta Tesis Doctoral titulada: "Receptores de interleucina-1 en el sistema nervioso central: Estudio de su regulación en relación con el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y en un modelo experimental de esclerosis múltiple".

Consideramos que tanto el contenido científico como la presentación de esta memoria reúnen las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que conste ante quien proceda, firmamos la presente en Madrid a veintinueve de Septiembre de mil novecientos noventa y cuatro



Los directores de la Tesis
Fdo: Carmen Guaza Rodríguez
José Borrell Andrés



Tesis que presenta
Fdo: Alberto LLedó Macau

A Beatriz

A mi padre

AGRADECIMIENTOS:

Quisiera mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de alguna forma u otra, han colaborado con este proyecto:

En primer lugar a la Dra. Carmen Guaza y al Dr. José Borrell por haber *asumido el riesgo* de aceptar a un *clínico* dentro de un laboratorio de investigación, permitiéndome realizar este trabajo. Pero por encima de ello valoro, sin embargo, su ayuda y amistad.

A la Dra. Catalina Betancur, con quien compartí el comienzo de estos experimentos y cuya colaboración fue inestimable.

Varias personas han sido responsables de mantener vivas mis inquietudes científicas a lo largo de estos años. Por orden *biográfico* serían: el Prof. José Planas Mestres, el Prof. Francisco Rubia Vila, el Prof. Barry G.W. Arnason y el Prof. Fermín Gómez Beltrán. Los cuatro son de alguna manera *culpables* de mis andanzas investigadoras.

A la Dra. Carmen Sandi, por su ayuda, compañía y amistad a lo largo de todo este tiempo.

Todas las personas con las que he convivido estos últimos años han tenido que, forzosamente, soportarme. Gracias, por su paciencia y amistad, tanto a Concha, Clara, Mani, José Ramón, Paco, Cesar, Joaquín, Julie, Paz, Svetlana, Joaquín y Sonia, Nieves, Carmen, Nacho y Luis Miguel.

Finalmente, quisiera agradecerle a mi mujer, Beatriz, las muchas horas de nuestro tiempo, que, generosamente, le regaló al Instituto Cajal.

Este trabajo ha sido financiado con ayudas de la DGICYT, programa de Promoción General del Conocimiento (PM92-0014) y del Plan Regional de Investigación de la Conserjería de Educación de la Comunidad de Madrid, Programa de Salud (C 137/92).

INDICE

INDICE

1.- INTRODUCCION	1
1.1. Interrelaciones entre los distintos sistemas del organismo para el mantenimiento de la homeostasis	1
1.2. Interleucina 1	5
1.3. Interleucina 1 en SNC	9
1.4. Receptores de IL-1 (IL-1R)	11
1.5. Receptores de IL-1 en SNC	12
1.6. IL-1 como modulador del eje H-H-A	14
1.7. La Esclerosis Múltiple: una enfermedad autoinmune mediada por la IL-1	17
1.8. Encefalomiелitis por el virus de Theiler: un modelo animal de Esclerosis Múltiple	19
2.- PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS	24
3.- MATERIAL Y METODOS	27
3.1. ANIMALES	27
3.1.1. Ratón	
3.1.2. Rata	
3.2. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	28
3.2.1. RATON	
3.2.1.1. Hipocampo	
3.2.1.2. Hipotálamo	
3.2.2. RATA	
3.3. TECNICA DE UNION AL RECEPTOR	30
3.4. CITOCINAS	32
3.5. TRATAMIENTOS "IN VIVO"	33

3.5.1. Tratamiento con lipopolisacárido bacteriano	33
3.5.2. Tratamiento con dexametasona	33
3.5.3. Tratamiento con corticosterona	34
3.5.3.1. Inyección sistémica	
3.5.3.2. Implantes de liberación continuada	
3.6.- TRATAMIENTOS "IN VITRO"	35
3.6.1. Tratamientos en homogenizados de membrana	35
3.6.2. Tratamientos en rodajas de hipocampo	35
3.7.- TECNICAS QUIRURGICAS	36
3.7.1. Adrenalectomía	36
3.7.2. Inyecciones intracerebrales	37
3.8.- MODELOS DE APLICACION DE ESTRES	38
3.8.1. Estrés acústico	38
3.8.2. Choque eléctrico inescapable	38
3.8.3. Estrés térmico	39
3.8.4. Técnicas de manipulación neonatal	39
3.9.- ENCEFALOMIELITIS INDUCIDA POR EL VIRUS DE THEILER	39
3.9.1. Inducción y seguimiento de la enfermedad	39
3.9.2. Tratamientos en la encefalomyelitis por TMEV	40
3.10. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS	41
4.- RESULTADOS	42
4.1. PUESTA A PUNTO DEL METODO DE UNION AL RECEPTOR EN HIPOCAMPO	42
4.1.1. Relación entre la concentración de proteínas y	

la unión al receptor de IL-1	42
4.1.2. Relación entre el tiempo de incubación y la unión al receptor de IL-1	43
4.1.3. Influencia de la temperatura en la unión al receptor de IL-1	43
4.1.4. Unión al receptor de IL-1 en distintas cepas de ratones	44
4.1.5. Unión al receptor de IL-1 en ratones BALB/c machos y hembras	44
4.1.6. Unión al receptor de IL-1 en ratón BALB/c con IL-1 β recombinante humana	45
4.1.7. Unión al receptor de IL-1 en ratón BALB/c con IL-1 β recombinante murina	45
4.1.8. Unión al receptor de IL-1 en rata Wistar con IL-1 α recombinante humana	46
4.1.9. Unión al receptor de IL-1 en rata Wistar con IL-1 β recombinante humana	46
4.1.10. Unión al receptor de IL-1 en rata Wistar con IL-1 β recombinante murina	47
4.2. UNION AL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOTALAMO	47
4.3. CARACTERIZACION Y CINETICA DEL RECEPTOR DE IL-1 EN EL HIPOCAMPO DE RATON BALB/c	48

4.4. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON GLUCOCORTICOIDES EN LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOCAMPO DE RATON BALB/c	49
4.4.1. Efectos de la administración aguda de corticosteroides sobre la unión al receptor de IL-1	49
4.4.2. Efectos de la administración subcrónica de corticosteroides sobre la unión al receptor de IL-1	49
4.4.3. Efectos de la administración crónica de corticosteroides sobre la unión al receptor de IL-1	51
4.4.4. Estudios de saturación para los efectos de los corticosteroides sobre la unión al receptor de IL-1	52
4.5. EFECTOS DE LOS DISTINTOS MODELOS DE ESTRES SOBRE LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1	52
4.5.1. Choque eléctrico inescapable	53
4.5.2. Estrés acústico	53
4.5.3. Estrés térmico	53
4.5.4. Manipulación neonatal (handling)	54
4.6. MODULACION DEL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOCAMPO DE RATON A TRAVES DE LA ADMINISTRACION PERIFERICA DE LIPOPOLISACARIDO (LPS)	54
4.7. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DEXAMETASONA SOBRE LA MODULACION INDUCIDA POR LPS EN LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1 EN RATONES	55

4.8. EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA (ADX) SOBRE LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1	56
4.9. EFECTO "IN VITRO" DE LOS CORTICOSTEROIDES EXOGENOS SOBRE LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1	57
4.9.1. Efecto de los corticosteroides "in vitro" sobre la unión al receptor de IL-1 en homogenizados de membrana de hipocampo de ratones BALB/c	58
4.9.2. Efecto de los corticosteroides "in vitro" sobre la unión al receptor de IL-1 en rodajas de hipocampo de ratones BALB/c	59
4.10. MODULACION DE LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOCAMPO EN LA ENCEFALOMIELITIS POR VIRUS DE THEILER, UN MODELO ANIMAL DE ESCLEROSIS MULTIPLE	61
5.- DISCUSION	65
5.1. LOCALIZACION Y CARACTERIZACION DEL IL-1-R EN CEREBRO	65
5.2. MODULACION DEL RECEPTOR DE IL-1 A TRAVES DE LA MANIPULACION DEL EJE H-H-A	74
5.3. MODULACION DEL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOCAMPO DE RATON MEDIANTE LA ADMINISTRACION PERIFERICA DE LIPOPOLISACARIDO	80
5.4.- MODULACION DEL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOCAMPO EN LA ENCEFALOMIELITIS INDUCIDA POR EL VIRUS DE THEILER	83
6.- CONCLUSIONES	89
7.- BIBLIOGRAFIA	91

1.- INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION

1.1. Interrelaciones entre los distintos sistemas del organismo para el mantenimiento de la homeostasis

Los organismos vivos homeotermos son *sistemas en estado estacionario* capaces de neutralizar y adaptarse a continuos cambios en su entorno sin modificar su constantes físicas. Esto era ya reconocido en la Grecia clásica, donde Heráclito fue el primero en sugerir que un sistema estático, que no sufre cambios, no corresponde a una situación natural y que la capacidad de mutar continuamente es algo intrínseco a la naturaleza. Empédocles, a su vez, propuso que toda materia consistía en una aposición dinámica de distintos elementos y cualidades y que se requería un balance armónico y continuo para la supervivencia de todo organismo. Estas primeras ideas sobre la necesidad de una continuo equilibrio en los seres vivos entre el medio externo y, lo que Claude Bernard (1859) había denominado *medio interno*, llevó siglos más tarde a Walter Cannon (1911) a proponer el concepto de *homeostasis*. Indudablemente, en el mantenimiento de dicha homeostasis en el organismo vivo homeotermo, encontramos uno de los mejores ejemplos de, lo que los físicos han llamado, un *sistema en estado estacionario*. Es decir un sistema que es capaz de tamponar, dentro de un determinado intervalo, los cambios que suceden en su entorno sin modificar sus constantes intrínsecas. Para realizar esta compleja tarea, el organismo requiere un mecanismo de información integrado, capaz de detectar todo tipo de variaciones en su entorno, así como en su *medio interno*, produciendo respuestas adaptativas, a través de modificaciones adecuadas en los sistemas compensatorios del organismo. Esta labor la van a protagonizar conjuntamente el sistema nervioso, el sistema endocrino (SE) y el

sistema inmune (SI), a través de lo que recientemente se ha denominado *red inmuno–neuro–endocrina*.

El sistema nervioso central (SNC) es el encargado principal de procesar la información que le aportarán desde el exterior los órganos de los sentidos y desde el interior el SI y el SE. El procesamiento de la información y la coordinación de las señales recibidas permitirá al resto del organismo desarrollar unas respuestas adecuadas. El SI tiene como función principal, en coordinación con el SNC y el SE, el control y defensa frente a las agresiones que alteren la homeostasis del organismo. Dentro de los estímulos capaces de ser interpretados como *agresiones* se incluyen las infecciones, los trastornos metabólicos, el dolor, el miedo, las heridas y hemorragias, entre otras. Por tanto, se va a requerir un sistema de transmisión de señales muy versátil y común a los tres componentes de esta *red inmuno–neuro–endocrina*.

Existen dos vías por las que el SNC se comunica con el SI: la primera es la vía SNC–sistema neuroendocrino, mediado fundamentalmente por el eje hipotálamo–hipofisario y sus respectivas hormonas o neuropéptidos y la segunda esta mediada por el sistema nervioso autónomo a través de la inervación directa de los órganos inmunes, como timo, bazo, ganglios linfáticos y médula ósea (ver Felten y Felten, 1991). Además, los linfocitos y los monocitos, células fundamentales en la ejecución de la respuesta inmune, poseen, entre otros, receptores para noradrenalina, el principal neurotransmisor dentro del sistema nervioso simpático y responden a la administración de agonistas adrenérgicos, así como a otros neurotransmisores (ver Chelmicka–Schorr y Arnason, 1990). Sin embargo, en el SI, a diferencia de lo que ocurre en el sistema nervioso, no existe una continuidad anatómica fija entre las distintas células. Por tanto, la comunicación dentro del SI, y desde el SI con el SNC, deberá establecerse a través

de moléculas secretadas por las células inmunes, capaces de trasladarse largas distancias dentro del organismo. Estos péptidos son transportados por la sangre hasta el órgano diana, donde producen sus efectos. Dichos péptidos se conocen en la actualidad con el nombre *citocinas*.

Como ejemplo de los efectos que el sistema nervioso ejerce sobre el SI, a través del sistema neuroendocrino, se pueden señalar varios péptidos hormonales. La prolactina, la hormona de crecimiento y la tirotropina ejercen efectos activadores sobre el SI. Así, por ejemplo, en animales hipofisectomizados se alteran las respuestas inmunes mediadas por células T, las mediadas por anticuerpos y el desarrollo de enfermedades autoinmunes experimentales (Nagy y Berczi, 1978). Si a estos animales hipofisectomizados se les administra prolactina, una de las hormonas hipofisarias eliminadas mediante la hipofisectomía, vuelven a ser parcialmente inmunocompetentes (Bernton y col, 1988). Del mismo modo, el tratamiento con bromocriptina, un inhibidor de la secreción de prolactina, inhibe múltiples procesos dentro del SI, que incluyen las respuestas mediadas por anticuerpos, la severidad de modelos experimentales de enfermedades autoinmunes como la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), la respuesta proliferativa de las células T a estímulos con diferentes lectinas, la secreción de interferón α , etc. (Bernton y col, 1988).

Pero quizá dentro del sistema neuroendocrino, sea el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (H-H-A), y los glucocorticoides, productos finales de la activación de dicho eje, los más relacionados con el control de la reactividad inmune. El hecho de que los glucocorticoides regulen la respuesta inmune se conocía desde mediados del siglo XIX. En la descripción inicial de Addison de la insuficiencia suprarrenal crónica, ya se destacaba que dichos pacientes tenían un mayor número de leucocitos (Addison, 1855).

Selye (1936) demostró que la respuesta al estrés, que hoy sabemos está mediada por el sistema nervioso autónomo, producía un aumento del tamaño de las glándulas adrenales, así como una atrofia tímica. Dicha atrofia era menor si los animales eran adrenalectomizados o hipofisectomizados, revelando con ello que el eje H-H-A podría ejercer de nexo de unión entre el sistema neuroendocrino y el SI.

Años más tarde se determinaría desde el punto de vista farmacológico el efecto inmunosupresor de los glucocorticoides, si bien su *función fisiológica* dentro del SI ha sido desconocida hasta hace pocos años. Sin embargo, a partir de los trabajos de grupo de Besedovski (Besedovski y Sorkin, 1977; Besedovski y col. 1981, 1983, 1986) se comenzó a entender dicha *función fisiológica* de estas hormonas. Estos autores demostraron que una de las funciones de los glucocorticoides en relación con el SI, es servir de freno a la cascada de reacciones que conlleva la activación de este sistema, una vez ha ejercido su acción. Una activación incontrolada del SI acabaría dañando al propio organismo. Esta inhibición que ejercen los glucocorticoides sobre el SI, la realizan bloqueando la secreción de los mensajeros del propio SI, en especial las llamadas citocinas. En relación con las citocinas, los glucocorticoides actúan en la mayor parte de los casos como inhibidores de la síntesis de éstas, evitando los efectos tóxicos sobre el organismo que producirían dichas citocinas a concentraciones elevadas. En la actualidad es conocido que los glucocorticoides inhiben la producción de al menos IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10 y TNF α (Kunicka y col, 1993). En el caso de la IL-1, los glucocorticoides parecen inhibir la transcripción, la transducción y la secreción de la misma (Kern y col, 1988; Oppenheim y Matsushima, 1988).

Así, como ejemplo de lo anteriormente expuesto, dentro de modelos animales de enfermedades autoinmunes uno de los más conocidos es la EAE,

desencadenada por la inyección de componentes de la mielina a ratas de la cepa Lewis. Estas ratas presentan una respuesta reducida en la secreción de hormona adrenocorticotropa (ACTH) y corticosteroides ante estímulos estresantes, debido a la regulación defectuosa del gen que codifica la síntesis del factor liberador de corticotropina (CRF) (Sternberg y col, 1989a, 1989b). De este modo el SI de estos animales presenta un defecto en su frenado, haciéndolos más susceptibles a padecer enfermedades autoinmunes.

Los glucocorticoides regulan a su vez la expresión de otras muchas proteínas (receptores de membrana, anticuerpos, etc) producidas por el SI, aunque los mecanismos genéticos sobre la interrelación y regulación de las zonas dentro del ácido desoxirribonucleico (DNA) a las que se unen los glucocorticoides (*Glucocorticoid Responding Elements* o GRE) y reguladores de genes productores de estas proteínas relacionadas con el SI, son poco conocidas. Hay que señalar que los efectos de los glucocorticoides en el SI son extremadamente variados (Munck y col, 1984), pudiendo producir linfo- y monocitopenia, aumento de neutrófilos, inhibición de la migración de los leucocitos hacia lugares donde exista una inflamación, inhibición de las células *natural killer* (NK). Parte de estas acciones están relacionadas con la síntesis y liberación de citocinas, o la modulación de sus receptores (ver Munck y Guyre, 1991).

1.2. Interleucina-1

Entre los neuropéptidos y hormonas encargados de transmitir información desde el SI al SNC, destacan, como hemos dicho anteriormente las citocinas, proteínas, inicialmente descubiertos en las células del SI, pero que en la actualidad extienden sus efectos a otros muchos órganos. La interleucina 1 (IL-1) es una de

estas citocinas, que junto con la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), forman un subgrupo de propiedades proinflamatorias afines. Estas tres citocinas estimulan la proliferación celular, activan a los linfocitos T y B e inician o suprimen la expresión de distintos genes responsables de la síntesis de varias proteínas (Dinarello, 1991).

La IL-1 fue descubierta hacia 1940 en los sobrenadantes de exudados con granulocitos. Estos sobrenadantes inyectados a animales de experimentación producían fiebre, surgiendo el nombre inicial de *pirógeno endógeno* (Atkins, 1960). En los años siguientes aparecieron nuevas propiedades de este *pirógeno endógeno*. En 1972, Gery y Waksman describen una proteína capaz de aumentar la respuesta de los linfocitos T a los mitógenos como la Concanavalina A. Esta proteína fue denominada *Factor activador de los linfocitos*. Estudios posteriores identificaron a la proteína denominada *pirógeno endógeno* y a aquella denominada *Factor activador de los linfocitos* como una misma molécula (Dinarello y col, 1988). Otras propiedades de la IL-1 fueron descritas y nominadas en principio de modo aislado. Hoy en día la denominación IL-1 abarca a los términos siguientes: pirógeno endógeno, factor activador de los linfocitos, mediador endógeno de los linfocitos, factor de las células mononucleares, catabolina, factor activador de los osteoclastos, hemopoyetina 1, factor neutrofílico promotor de la proliferación linfocitaria, factor inhibidor del crecimiento tumoral 2 y factor inhibidor del crecimiento de los melanomas (Dinarello, 1991). En la actualidad se considera que los procesos en los que la IL-1 está involucrada incluyen procesos inflamatorios, metabólicos, fisiológicos, hematopoyéticos e inmunológicos.

En 1984 se clonan por primera vez dos genes que codifican la síntesis de los dos tipos de IL-1 conocidos en la actualidad: la IL-1 α y la IL-1 β (Lomedico y col, 1984; Auron y col, 1984). Ambas moléculas presentan en humanos una

homología de sólo un 26% de sus aminoácidos (March y col, 1985; Gray y col, 1986; Wingfield y col, 1986). Sin embargo existe entre ambas una gran correlación tanto en su estructura como en la mayoría de sus funciones. Además la similitud entre las IL-1 de las distintas especies es muy elevada, siendo para la IL-1 α de un 60-70 % y para la IL-1 β de un 60-80 % (Dinarello, 1991). Ambas formas, α y β , tienen un peso molecular de 17.500 Da y son codificadas desde genes diferentes situados en el cromosoma 2 (Webb y col, 1986).

Tanto la IL-1 α como la IL-1 β se sintetizan en forma de moléculas precursoras denominadas pro-IL-1 (31.000 Da). La transcripción y transducción del m-RNA mensajero, que codifica la síntesis de IL-1 esta bajo control separado. Así existen estímulos que facilitan tanto la transcripción como la transducción, y otros que sólo permiten una transcripción sin transducción. Varias enzimas (proteasas), cortan la porción N-terminal quedando la forma madura de 17.500 Da unida a la porción C-terminal. Muteinas (porciones moleculares más pequeñas obtenidas por particiones artificiales) de la molécula de IL-1 madura tienen una actividad específica menor que la molécula completa. También la pro-IL-1, tanto α como β , tienen un cierto grado de actividad específica (Rosenwasser y col, 1986; Jobling y col, 1988).

Una tercera proteína incluida en el grupo de las interleucinas-1 fue purificada y sintetizada recientemente (Eisenberg y col, 1990; Mazzei y col, 1990; Carter y col, 1990). Dicha proteína, con un peso molecular de 23-26 kD, tiene una afinidad similar por el receptor para la IL-1 (IL-1R), que la IL-1 α y la IL-1 β . Esta molécula, denominada *antagonista del receptor de IL-1* (IL-1ra), sin embargo, no activa a la célula diana una vez se ha unido al IL-1R, comportandose por tanto como un antagonista puro del receptor (Arend, 1991). El IL-1ra es considerado como una molécula reguladora de los efectos de la IL-1 y tendría un papel

importante en el control de los efectos de dicha citocina, de forma similar a lo que se ha comentado anteriormente en relación con los glucocorticoides.

En la actualidad se han descrito múltiples efectos tras la administración de IL-1 en animales de experimentación y en voluntarios sanos. A distintas dosis la IL-1 produce fiebre, neutrofilia, aumento de los niveles circulantes de otras citocinas como la IL-2, la IL-6 o el factor estimulador de colonias, aumento de la síntesis de proteínas de fase aguda hepáticas, disminución de los niveles de albúmina, hierro y zinc, anorexia, inducción del sueño y aumento de los niveles séricos de ACTH y glucocorticoides. A dosis elevadas la IL-1 produce hipotensión y leucopenia (Dinarello, 1991).

Se ha sugerido que diferentes regiones de la molécula son responsables de los diferentes efectos. Así por ejemplo, en la IL-1 β la región de los aminoácidos 208 a 240 posee efectos sobre la inducción del sueño y la fiebre, pero no activa a los linfocitos T (Obal y col, 1990).

Aunque inicialmente la IL-1 se describió en células del SI, y fundamentalmente en monocitos/macrófagos activados, hoy se conocen otras muchas células capaces de producir esta citocina. Se ha descrito la producción de IL-1 en cantidades variables en las siguientes células: monocito/macrófago, neutrófilos, linfocitos T y B, células NK, células endoteliales, células musculares lisas, fibroblastos, células sinoviales, células dendríticas de la dermis, queratinocitos y células del epitelio digestivo (Dinarello, 1991).

1.3. – Interleucina-1 en SNC

Estudios para localizar IL-1 en cerebro han demostrado la presencia de fibras y cuerpos celulares que presentan inmunorreactividad para IL-1 tanto en humanos (Breder y col, 1988) como en roedores (Lechan y col, 1990; Haour y col, 1990; Takao y col, 1990). Dentro del SNC también se ha descrito la producción de IL-1 por células microgliales (Giulian y col, 1986; van Dam y col, 1992), macrófagos (van Dam y col, 1992), astrocitos (Guilian y Lachman, 1985; Nieto-Sampedro y Berman, 1987) y neuronas (Breder y col, 1988). Además, las células de Schwann dentro del sistema nervioso periférico producen igualmente IL-1 (Bergsteinsdottir y col, 1991). En la actualidad se han descrito múltiples efectos de la IL-1 dentro del SNC, que incluyen astrogliosis y neovascularización (Guilian y col, 1988), inhibición de la potenciación de larga duración (LTP) (Katsuki y col, 1990), inducción del factor de crecimiento neuronal (Spranger y col, 1990), alteraciones en los trazados del electroencefalograma (Saphier, 1992), anorexia (Plata-Salaman y col, 1988), fiebre (Blatteis y col, 1992) y la activación del eje H-H-A (Besedovski y col, 1986; Berkenbosch y col, 1987; Sapolski y col, 1987; Cambroner y col, 1989).

Aunque en algunos estudios se detecta mRNA para la IL-1 en diferentes áreas del cerebro en ratas (Bandtlow y col, 1990) y en hipocampo de ratón (Cunningham y col, 1991), sin embargo, en la mayoría de los casos las células nerviosas no producen IL-1 o mRNA para esta citocina en condiciones basales, precisando un estímulo para iniciar la síntesis de dicha molécula. El estímulo más habitual para inducir la síntesis de IL-1 lo constituyen las endotoxinas, como los lipopolisacáridos, u otras citocinas, como el interferón gamma. También pueden inducir la síntesis de IL-1 las exotoxinas de bacterias como estafilococos y

estreptococos, los virus vivos y moléculas, como los componentes del sistema de complemento, otras citocinas, trombina y sales biliares (Dinarello, 1991).

Si bien la producción de IL-1 dentro del SNC esta bastante aceptada en la actualidad, el mecanismo por el que la IL-1 puede ejercer efectos centrales constituye un tema de gran controversia. El principal inconveniente con el que se encuentran los investigadores es la aparente impermeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) a la IL-1 (Kluger, 1990). Este hecho ha planteado el problema de como consigue, por tanto, la IL-1 atravesar dicha BHE, para comunicarle al SNC los cambios que están sucediendo en la periferia. Varios autores han propuesto diferentes alternativas para explicar el paso de la IL-1 desde la periferia al SNC. En primer lugar se propuso que la IL-1 podría penetrar al SNC por zonas que carecen de BHE, como son los órganos circumventriculares. De entre ellos el *organum vasculosum lamina terminalis* (OVLT) por su proximidad con el hipotálamo, sería uno de los lugares de mayor interés en este contexto (Katsuura y col, 1990). Se ha propuesto igualmente que en procesos inflamatorios, macrófagos activados pueden penetrar en el SNC y podrían ser los responsables de la producción de IL-1 durante la inflamación. Banks y col (1991) afirman que la IL-1 periférica podría acceder al SNC a través de un sistema de transporte activo para péptidos. Finalmente, Gottschall y Arimura (1992) proponen un mecanismo que salvaría la BHE utilizando moléculas intermedias como co-mensajeros. Según este grupo, la IL-1 activaría un IL-1R en los astrocitos pericapilares en el OVLT, estimulando la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂). Dicha PGE₂ difundiría hasta las neuronas del área preóptica que se activarían transmitiendo dicha señal hasta las neuronas productoras de CRF localizadas en la región parvocelular del nucleo paraventricular del hipotálamo. Sea cual fuere el mecanismo celular por el que la IL-1 parece superar la BHE, actualmente se acepta que estímulos desde sangre periférica son capaces de se integrados dentro del SNC. Algunos autores

(Berkenbosch y col, 1992) han propuesto que existirían dos vías principales de descodificar los mensajes transmitidos por la IL-1. Aquellos procedentes desde la *perifería con información relativa a cambios detectados en el SI, serían vehiculados* a través de las neuronas. Por el contrario, los mensajes originados dentro del propio SNC y relacionados con crecimiento y reparación neuronal en relación con trauma o en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, se procesarían a través de la glía. Aunque desde el punto de vista teórico esta proposición es muy atractiva, sólo investigaciones posteriores podrán aclarar si es cierta o no.

1.4.- Receptores de IL-1 (IL-1R)

Se han descrito IL-1R en casi todas las tejidos estudiados. En sangre periférica se conocen dos tipos de IL-1R. El tipo I con un peso molecular de 80 kD y expresado característicamente en los linfocitos T, aunque también en otras muchas células del organismo. Este IL-1R tipo I está compuesto por una porción extracelular glicosilada en varios puntos, una única porción transmembrana y una región citosólica larga de 213 aminoácidos (Sims y col, 1988). El IL-1R tipo II tiene un menor peso molecular (68 kD) y es expresado característicamente por los linfocitos B. La diferencia estructural más significativa frente al IL-1R tipo I viene dada por su porción citosólica mucho más corta de 29 aminoácidos (Bomsztyk y col, 1989; Chizzonite y col, 1989).

Ambos receptores son productos de genes distintos, existiendo únicamente un 28% de homología entre los aminoácidos de las porciones extracelulares de ambas moléculas (Dower y col, 1990). Sin embargo, y, a pesar de la escasa similitud molecular, ambos receptores tienen afinidad por la IL-1 α , la IL-1 β y el

antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra). En células de sangre periférica la afinidad de la IL-1 α y de la IL-1 β por el IL-1R tipo I es comparable. Sin embargo, la IL-1 β parece presentar una mayor afinidad por el IL-1R tipo II. El IL-1ra se comporta de forma similar a la IL-1 α , teniendo una menor afinidad que la IL-1 β por el IL-1R tipo II (Arend, 1991). Desde el punto de vista funcional, las diferencias entre ambos tipos de receptor son materia de investigación en la actualidad. La capacidad del receptor tipo I de transmitir una señal al interior de la célula es conocida actualmente (Dower y col, 1985; Dower y col, 1986; Bird y Saklatvala, 1986; Bird y col, 1988; Sims y col, 1988; Gallis y col, 1989). Por el contrario, la función del IL-1R tipo II es mucho más controvertida. Para algunos autores, no parece tener una función en cuanto a transmisión de señal, sino que actuaría como un receptor truncado compitiendo por la IL-1 y regulando así la accesibilidad al receptor tipo I que sería el fisiológicamente funcional (Colotta y col, 1993).

Aunque inicialmente se describieron líneas celulares que expresaban un alto número de receptores (Löwenthal y MacDonald, 1986), posteriormente se ha visto que esta situación está invariablemente asociada a distintos estímulos inmunológicos. Hoy sabemos que las células en condiciones basales expresan muy pocos receptores (entre 100 y 200 IL-1R/célula) (Dinarello, 1991; Cunningham y De Souza, 1993), siendo éste uno de los datos principales para entender la biología de este sistema.

1.5.- Receptores de IL-1 en el SNC

La existencia de IL-1 en el SNC y los múltiples efectos de esta citocina sobre el mismo, llevaron a la búsqueda de un receptor para IL-1 dentro del SNC. En el SNC de ratones se ha descrito un IL-1R de alta afinidad tanto por técnicas de

autorradiografía (Haour y col, 1990; Ban y col, 1991), como por ensayos de unión al receptor (Takao y col, 1990). Los datos obtenidos en cerebro de rata, sin embargo, son mucho menos uniformes. Si bien algunos autores describen un sitio de unión para IL-1 por autorradiografía (Farrar y col, 1987) y por técnicas de fijación al receptor (Katsuura y col, 1988), estos resultados no han podido ser reproducidos por otros grupos.

Dentro del SNC de ratón la mayor concentración de IL-1R se localiza en hipocampo, especialmente en giro dentado, en plexos coroideos y en hipófisis y en mucho menor número en otras regiones del cerebro que incluyen corteza cerebral, cerebelo, bulbo olfatorio y cuerpo estriado (Haour y col, 1990; Takao y col, 1990, Ban y col 1991). Regiones como el hipotálamo o el bulbo olfatorio presentan con técnicas de unión al receptor concentraciones bajas de IL-1R (Takao y col, 1990), que no se recogen en los estudios de autorradiografía (Haour y col, 1990; Ban y col, 1991). Este IL-1R aislado en el SNC tiene unas características cinéticas similares a las descritas para el IL-1R detectado en los linfocitos T, representando una proteína con peso molecular de 80 kD. Además, por técnicas de hibridación in situ se ha detectado mRNA para el IL-1R tipo I en distribución superponible a la detectada por los estudios de autorradiografía descritos anteriormente (Cunningham y col, 1992). Todos estos hallazgos parecen indicar que el IL-1R detectado dentro del SNC es del tipo I. Sin embargo, Ban y col. (1992), usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido incapaces de detectar mRNA para el IL-1R tipo I en cerebro de ratones. Muy recientemente, Luheshi y col. (1993) estudiando el efecto de la IL-1 sobre la termogénesis e inducción de fiebre en la rata y usando un anticuerpo específico frente al IL-1R tipo II, proponen, que la IL-1 β induce fiebre a través de un IL-1R tipo II localizado probablemente en hipotálamo. Los efectos de la IL-1 α en cerebro, según estos mismos autores, serían independientes del receptor tipo II. Sin embargo, la

ausencia de una demostración más directa de la existencia en cerebro de un IL-1R tipo II hacen que, hoy por hoy, sólo se acepte la presencia en SNC de un IL-1R tipo I.

En cuanto a su localización celular, recientemente se han descrito sitios de unión para la IL-1 en astrocitos, aunque no así en microglia (Ban y col, 1993). Por otro lado en los estudios de unión al receptor la administración de colchicina (Ban y col, 1991) o ácido quinolínico (Takao y col, 1990), que lesionarían las neuronas respetando a las células gliales, inhibían la unión al receptor observada en los estudios de animales no tratados. De este hallazgo los autores concluían que dichos receptores debían localizarse en neuronas.

1.6.- IL-1 como modulador del eje H-H-A

Como se ha comentado anteriormente una de las vías por la que el sistema neuroendocrino se comunica con el SI es a través del eje H-H-A. Desde el hipotálamo se secreta el factor liberador de corticotropina (CRF) que regula la síntesis y secreción de hormona adrenocorticotropa (ACTH) desde la hipófisis (Rivier y Plotski, 1986). El CRF es un péptido de 41 aminoácidos que se sintetiza principalmente en las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo. Estas neuronas proyectan sus axones hacia el plexo capilar en la zona externa de la eminencia media desde donde el CRF alcanzará la adenohipófisis. Allí estimulará la síntesis y liberación de ACTH, entre otros derivados de la proopiomelanocortina (POMC). Otras moléculas como la oxitocina, la vasopresina o las catecolaminas pueden producir también la liberación de ACTH. Esta ACTH activará en las células de la corteza adrenal la síntesis y liberación de glucocorticoides. Todo el proceso, desde la secreción de CRF hasta la liberación de

glucocorticoides a la circulación sanguínea se produce en pocos minutos. Los glucocorticoides a su vez actuarán sobre sus receptores, fundamentalmente citosólicos, que transportados hasta el núcleo regularán la expresión de diferentes genes en múltiples células del organismo. A su vez los glucocorticoides inhibirán por mecanismos de retroalimentación su propia secreción en la glándula adrenal, así como la secreción de ACTH y CRF en hipófisis e hipotálamo respectivamente (ver Sapolski, 1992). Más recientemente se ha descrito un control suprahipotalámico del eje H-H-A y los estudios de Sapolski (1986, 1992) han demostrado la existencia de un control tónico inhibitorio desde el hipocampo, que inhibiría la secreción de CRF.

Hemos visto que el mecanismo de funcionamiento del eje H-H-A desde el hipotálamo hasta las glándulas adrenales y su regulación intrínseca están bien caracterizados. Mucho menos conocida es, sin embargo, la vía por la que estímulos desde el SI interactúan con dicho eje. En los últimos años se ha acumulado mucha información en torno al papel de la IL-1, entre otras citocinas, como molécula encargada de comunicar al SI con el eje H-H-A.

La activación del SI produce la secreción de IL-1 desde los monocitos/macrófagos en tejidos periféricos (Natan, 1987). Este incremento de los niveles de IL-1 se correlaciona con la activación del eje H-H-A a través del CRF (Sapolski y col, 1987; Berkenbosch y col, 1987; Uehara y col, 1987; Cambroner y col, 1989), de la ACTH (Woliski y col, 1985; Besedovski y col, 1986; Katsuura y col, 1988; Cambroner y col, 1992) e incluso de la secreción de glucocorticoides por la propia glándula adrenal (Roh y col, 1988; Whitcomb y col, 1988; Winter y col, 1990; Andreis y col, 1991; Tominaga y col, 1991).

Sin embargo, las respuestas a la administración de IL-1 por vía periférica o por vía central pueden no estar mediadas por los mismos mecanismos. Por ejemplo, los antagonistas adrenérgicos bloquean la liberación de ACTH tras la inyección de IL-1 intracerebroventricular (icv) (Weinfeld y col, 1989), pero no así si la IL-1 es administrada por vía periférica (Rivier y col, 1989). Igualmente el aumento de ACTH tras la administración de ACTH icv o intravenoso (iv) es inhibido por la administración de un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas como la indometacina. Sin embargo, esta inhibición no se produce si el incremento de la ACTH se produce tras inducir estrés a los animales (Katsuura y col, 1988, 1990). Estos experimentos muestran que deben existir varios mecanismos diferentes para la activación del eje H-H-A a través de la IL-1 y a diferentes niveles del eje.

Aunque las acciones de la IL-1 sobre el eje H-H-A a nivel del hipotálamo están bien establecidas, en la actualidad la existencia de IL-1R en el hipotálamo no parece completamente aclarada. Como hemos comentado anteriormente, el hipocampo es uno de los mayores lugares del SNC con mayor concentración de estos receptores. Por otro lado es conocido, que el hipocampo contiene la mayor concentración de receptores para glucocorticoides en cerebro (Reul y De Kloet, 1985). Ambos receptores parecen colocarse en las neuronas de las capas piramidal y granular. Es posible, por tanto, que sea a este nivel donde se produzca la mayor interacción de la IL-1 y los glucocorticoides en relación con el eje H-H-A, aunque no es por supuesto excluyente de los otros niveles de funcionalidad del eje. Por tanto, el hipocampo parece, al menos teóricamente, un lugar anatómico adecuado para estudiar la posible interrelación entre los glucocorticoides y la IL-1.

1.7.- La Esclerosis Múltiple: una enfermedad autoinmune mediada por la IL-1

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria, que produce una destrucción parcheada de la mielina dentro del SNC. La etiología de la enfermedad es actualmente desconocida, pero se sabe que va a estar mediada por mecanismos inmunes (ver Reder y Arnason, 1985; LLedó, 1994). En la EM, células del SI activadas frente a un antígeno de la mielina penetran desde sangre periférica al SNC y destruyen la mielina, bien directamente a través de los macrófagos, o bien por mediación de las citocinas secretadas por éstos o por los linfocitos T. Sin embargo, el mecanismo que desencadena dicha respuesta inmune es igualmente desconocido. Una de las teorías etiológicas más interesantes propone la existencia de una posible infección viral como desencadenante de la EM. Dicha infección podría afectar directamente a los oligodendrocitos, células responsables de la síntesis de la mielina dentro del SNC, alterando la síntesis de dicha mielina y produciendo una respuesta inflamatoria frente a los productos de degradación de ésta. Una segunda posibilidad, podría ser que el virus persistiese de forma latente en el SNC, perpetuando una activación inmune, que como fenómeno colateral produciría la destrucción de la mielina. En tercer lugar se ha propuesto que el virus, por similitud antigénica con determinados antígenos de la mielina, pudiese desencadenar una reacción autoinmune frente a antígenos mielínicos, por anticuerpos dirigidos inicialmente contra él (ver Waksman y Reingold, 1986).

Sin embargo, a pesar que desde hace 50 años se ha implicado a más de 15 virus distintos como responsables de iniciar la respuesta inmune en la EM, hasta el momento actual, ninguno de ellos ha podido ser relacionado de forma inequívoca con la enfermedad (Cook y Dowling, 1980; Waksman y Reingold, 1986; Waksman, 1989; Ehrlich y col, 1991). Si parece establecido, sin embargo, que dicha infección viral debe producirse durante la edad infantil, pues estudios epidemiológicos han

demostrado, que si una persona procedente de una zona de alta prevalencia para EM, como son las regiones situadas al Norte del paralelo 45 en el hemisferio Norte, se traslada a una zona de baja incidencia como son las regiones cercanas al Ecuador, asumirá la prevalencia de su región de destino, si dicho traslado se produce antes de los 14 años. Por el contrario, si la migración se produce después de esa edad, prevalecerá el riesgo de la región de procedencia (ver Martyn, 1991).

Más conocida es la relación con una determinada predisposición genética a padecer esta enfermedad. Así, por ejemplo estudios en gemelos univitelinos, han demostrado una concordancia muy alta entre ambos gemelos (Ebers y col, 1986; Kinunen y col, 1988; Ragheb y Lisak, 1993). En poblaciones menos seleccionadas se ha demostrado igualmente una asociación fuerte con determinados antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Sherritt y col, 1992).

Sea cual fuere el desencadenante de la EM, hoy conocemos mucho mejor los mecanismos que median en la lesión de la mielina en esta enfermedad. Entre estos mecanismos, como hemos citado previamente, se incluyen la activación de células del sistema inmune y la liberación de citocinas con efectos tóxicos sobre la mielina. Una de estas citocinas *mielinotóxicas* es la IL-1. En la EM se han encontrado niveles elevados de IL-1 tanto en sangre periférica (Selmaj y col, 1988), como en líquido cefalorraquídeo (Hauser y col, 1990). Por otro lado, mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha detectado IL-1 en placas de desmielinización activa en estos pacientes (Hoffman y col, 1986). Estos datos, muestran que esta citocina está implicada, junto con otras como el IFN- γ o el TNF- α , en el proceso de desmielinización presente en esta enfermedad. Así pues, el estudio del comportamiento de la IL-1, ya no sólo en situaciones fisiológicas, sino en un modelo de enfermedad autoinmune ayudaría a entender la génesis de procesos autoinmunes como la EM y, a lo mejor, a desarrollar nuevas terapéuticas.

1.8.- Encefalomiелitis por el virus de Theiler: un modelo animal de Esclerosis Múltiple

El virus de Theiler (TMEV) un picornavirus del género cardiovirus, es un patógeno entérico en ratones (Olitski, 1940; Walker, 1964). Sin embargo, la inoculación intracerebral del TMEV, en ratones genéticamente predispuestos, como la cepa SJL/J, produce una encefalomiелitis de curso bifásico y con características muy distintas en ambas fases (Theiler, 1937; Daniels y col, 1952; Lipton, 1975).

Dentro del los virus TMEV existen dos subgrupos en función de su comportamiento biológico y otras características virológicas (Friedmann y Lorch, 1985). El subgrupo GDVII incluye las cepas GDVII y FA y el subgrupo TO incluye las cepas DA, BeAn, WW, TO y Yale entre otras. La inoculación de cepas del subgrupo GDVII, altamente virulentas, a ratones menores de cuatro semanas produce una encefalitis fatal tras un breve periodo de incubación (Liu y col, 1967). La inyección intracerebral de cepas del subgrupo TO produce una enfermedad bifásica caracterizada por una fase inicial en la que se produce una encefalomiелitis aguda, similar a la producida por el virus de la polio en humanos, y una fase crónica caracterizada por una desmielinización similar a la observada en la Esclerosis Múltiple en humanos. Clínicamente los virus del subgrupo TO presentarán las características clínicas que se describen a continuación.

FASE AGUDA: Un porcentaje alto de los animales infectados desarrollan entre la primera y tercera semana post-infección una parálisis flácida. La intensidad de dicha parálisis es variable y depende de la dosis de TMEV inyectada. Los ratones con cuadros más severos, que evolucionan hacia la quadriparesia, mueren durante la fase aguda de la enfermedad. Los animales con una parálisis de las

extremidades posteriores y aquellos con formas más leves de afectación sobreviven a esta fase aguda. De este grupo de supervivientes una parte se recuperará, mientras que aquellos animales que presentaron una paraparesia severa, no recuperarán la marcha.

En la fase aguda el virus se detecta a partir del 5º día fundamentalmente en sustancia gris produciendo cromatolisis, neuronofagia y proliferación microglial. Las zonas más afectadas son el tálamo, tronco cerebral y médula espinal (Lipton, 1975; Dal Canto y Lipton, 1982), así como especialmente el hipocampo (Roos y Casteel, 1992). La afectación histológica del hipocampo es máxima a partir del día 12 post-inoculación (Roos y Casteel, 1992). El principal tipo celular afectado en esta fase es la neurona, donde el TMEV es capaz de replicarse activamente (Lehrich y col, 1976; Dal Canto y Lipton, 1982), aunque también se localiza en menor número en astrocitos y macrófagos (Brahic y col, 1981; Stroop y col, 1982).

Desde el punto de vista serológico se detectan anticuerpos frente al TMEV a partir del día 7 post-infección que persistirán elevados durante toda la enfermedad (Friedmann y Lorch, 1985).

FASE CRONICA: Aquellos animales que superen la fase aguda de la enfermedad, mejorarán de su sintomatología tras la 3ª semana, si la parálisis durante la fase aguda no fue muy severa. Estos animales, y aquellos que recibieron inyecciones de virus atenuados por múltiples pases por cultivos, desarrollarán a partir de la 5ª semana la sintomatología que caracterizará la segunda fase de la enfermedad y que es una paresia espástica, producida por la desmielinización localizada fundamentalmente en la médula espinal. Esta segunda fase de la enfermedad va a estar mediada por el sistema inmune, observándose infiltrados importantes de monocitos/macrófagos y células plasmáticas en la sustancia blanca afectada (Dal

Canto y Lipton, 1982). En esta fase, además del monocito/macrofago, el TMEV se detecta en menor concentración en oligodendrocitos (Rodriguez y col, 1983) y astrocitos. Aunque a títulos muy bajos es posible detectar el TMEV persistentemente en estas células a lo largo de toda la vida del animal. Igualmente los títulos de anticuerpos, frente al virus, que aparecieron en la fase aguda, se mantendrán elevados en relación a controles durante toda la fase crónica.

No todos los animales son afectados por el TMEV, existiendo cepas sensibles como los SJL/J, otras de susceptibilidad intermedia como las cepas C3H/He y Swiss y finalmente cepas de baja sensibilidad como la C57BL/6 (Friedmann y Lorch, 1985). Algunas subcepas de BALB/c, como los BALB/cByJ (Nicholson y col, 1994) y la BALB/cCum (Clatch y col, 1987) son resistentes a la infección, mientras que las subcepas BALB/cJ y BALB/cAnNCr son susceptibles a padecer la enfermedad (Nicholson y col, 1994). Estos datos son de especial importancia a la hora de elegir los animales control. La susceptibilidad a padecer la enfermedad va a estar determinada por un sistema multigénico. Clatch y col (1985) determinaron una relación positiva con un gen de la región D de del complejo H-2 en el sistema mayor de histocompatibilidad (MHC). Otros autores han encontrado una asociación con otro gen que codifica la porción constante de la cadena β del receptor de la célula T (TCR) (Melvold y col, 1987; Rodriguez y col, 1993). Recientemente Kilpatrick y Lipton (1991) han determinado que la susceptibilidad celular a ser infectada por el TMEV depende fundamentalmente de que expresen una proteína de membrana de 34 kD. Aquellas células que presenten dicho *receptor* para el TMEV podrán ser infectadas y las que carezcan de dicha proteína serán resistentes al virus. En la actualidad no es conocido si las cepas de ratones sensibles a padecer la enfermedad expresan dicha proteína P34.

El modelo de EM producido por la inyección de virus de Theiler presenta muchas similitudes con la enfermedad en humanos. En primer lugar, apoyaría la teoría etiológica viral de dicha enfermedad. Además, la existencia de un margen en el tiempo entre la infección viral y la aparición de la sintomatología clínica, secundaria a la desmielinización, en los ratones, coincide con los estudios epidemiológicos, que presuponen, que la noxa que va a desencadenar la enfermedad debe actuar en la edad infantil. Del mismo modo, si la inyección del TMEV se produce en ratones SJL/J adultos, la enfermedad será mucho más atenuada o en muchos casos no llegará a producirse. Igualmente coinciden la enfermedad en humanos con el modelo en ratones, en que en ambos existe una predisposición genética, existiendo cepas de ratones sensibles a presentar un síndrome clínico y desmielinización tras la infección por el TMEV y otras resistentes. También se ha demostrado, al menos in vitro, que la infección con TMEV de astrocitos de ratones SJL/J produce un incremento en la liberación de IL-1 por esas células, no ocurriendo así con astrocitos procedentes de cepas resistentes (Rubio y Torres, 1991). Por tanto, parece pues que la IL-1 va a tener también un papel de mediador inmune en este modelo de enfermedad.

Finalmente, el hecho de que se hayan relacionado la existencia de una hiporreactividad del eje H-H-A en ratas susceptibles a desarrollar enfermedades autoinmunes como la EAE, otro modelo experimental de EM, relaciona posibles trastornos en el eje con esta patología (Sternberg 1989a, 1989b). En la actualidad la regulación del eje H-H-A y de los receptores de la IL-1 en hipocampo como mediadores en la comunicación del SI con el sistema neuroendocrino, tanto en procesos fisiológicos como en procesos patológicos, es absolutamente desconocida.

El conocimiento de las vías de comunicación entre el SNC y el SI, el papel de la IL-1 en el SNC y la regulación de sus receptores centrales forman un intrincado sistema, que media en el desarrollo de procesos fisiológicos y patológicos como las enfermedades autoinmunes. Es posible que la comprensión de los mecanismos que subyacen a esta red permita ajustar más eficazmente los tratamientos de dichas enfermedades, que se han sustentado, curiosamente, en el uso de corticosteroides.

2.- PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS

2.- PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS

Dentro del contexto de la relación que se establece entre los distintos sistemas del organismo, destaca la que establecen el Sistema Nervioso Central (SNC), el Sistema Endocrino (SE) y el Sistema Inmune (SI). Estos tres sistemas poseen mediadores comunes entre los que destacan las citocinas. De todas las citocinas, sin duda la mejor caracterizada es la IL-1, pues se ha descrito su existencia tanto en tejidos periféricos, como, últimamente, en el SNC. También los receptores de IL-1 han sido caracterizados a estos tres niveles, si bien su regulación, especialmente en el SNC, no es conocida. Por consiguiente al comenzar este trabajo nos planteamos las siguientes metas:

1.- El primer objetivo de nuestro trabajo fue localizar y caracterizar el receptor para interleucina-1 (IL-1R) en el SNC de ratones y rata. Para ello se utilizó un ensayo de unión al receptor aplicándose a homogenizados de membranas celulares procedentes del hipocampo e hipotálamo. Se estudiaron las distintas afinidades de diferentes formas de IL-1 y analizaron las posibles diferencias existentes entre distintas cepas de ratones, así como en la rata Wistar.

2.- Una vez localizado y caracterizado el IL-1R se estudió su regulación, fundamentalmente en hipocampo, a través de distintas manipulaciones del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (H-H-A) con objeto de conocer si el receptor central de IL-1 era sensible a cambios neuroendocrinos relacionados con dicho eje:

2.1. Para determinar la posible modulación del IL-1R a través de los glucocorticoides, se estudió el efecto de la administración *in vivo* de

corticosterona y dexametasona, a distintas dosis y en distintas pautas. La administración se realizó por vía sistémica.

2.2. Se estudió igualmente el efecto de la administración *in vitro* de distintas dosis de glucocorticoides sobre la unión al receptor de IL-1, tanto en homogenizados de membranas, como en rodajas de hipocampo.

2.3. Se estudió el efecto de la aplicación de diferentes modelos de estrés sobre la capacidad de unión de la IL-1 a su receptor. Los ratones fueron sometidos a diferentes tipos de estrés como estimulación acústica, exposición al frío y a choque eléctrico inescapable.

2.4. Con objeto de analizar los efectos de la privación de corticosteroides sobre la modulación del receptor de IL-1 en hipocampo de ratón se utilizaron diferentes diseños experimentales, que disminuyeran los niveles de corticosteroides. Para ello, en primer lugar, se utilizaron técnicas de manipulación neonatal, capaces de modificar la respuesta del eje H-H-A de forma crónica y persistente y, en el animal adulto, de disminuir los niveles basales de glucocorticoides, así como la capacidad de incrementar los niveles circulantes en respuesta al estrés. El efecto de la ausencia total de glucocorticoides sobre la unión al receptor de IL-1 se estudió en animales adrenalectomizados a corto y medio plazo.

3.- La tercera parte de este trabajo estuvo encaminada a valorar los efectos de la administración periférica de lipopolisacárido (LPS), uno de los mayores estímulos para la liberación de IL-1 desde macrófagos en sangre periférica, sobre la unión al receptor de IL-1 en hipocampo. Se estudió igualmente los efectos del tratamiento con dexametasona sobre la regulación que pudiese ejercer la administración de LPS sobre el receptor de IL-1.

4.- En la última parte se analizó el efecto de la inyección intracerebral de virus de Theiler (TMEV) sobre la regulación de receptores de IL-1 en hipocampo. El TMEV es un inductor de la liberación de IL-1, además de utilizarse para producir un modelo experimental de Esclerosis Múltiple en ratones susceptibles de la cepa SJL/J, que desarrollan una encefalomiелitis crónica. Se estudió el perfil cronológico de los cambios experimentados en el receptor de IL-1 por la infección con el virus y la influencia del tratamiento con dexametasona en este modelo.

3.- MATERIAL Y METODOS

3.- MATERIALES y METODOS

3.1. ANIMALES

3.1.1. RATON:

La mayoría de los experimentos se realizaron en ratones BALB/c machos, adultos (20–30 g) y SJL/J machos de 4–5 semanas de edad. En algunos experimentos aislados se usaron ratones machos, adultos de las cepas Swiss CD1, C3H/He, C57/BL6.

Los ratones BALB/c y SJL/J procedían de la colonia del Instituto Cajal (CSIC, Madrid). Los ratones Swiss, los C3H/He y los C57/BL6 fueron adquiridos en Charles River España.

3.1.2. RATA:

En algunos experimentos se usaron ratas macho adultas de la cepa Wistar (250±50 g) de la colonia del Instituto Cajal (CSIC, Madrid).

Todos los animales se mantuvieron en jaulas con 4–6 animales por jaula. Dispusieron de agua y comida *ad libitum* y, en los experimentos en los que se realizó una adrenalectomía, además de suero salino al 0.9% también *ad libitum*.

El estabulario se ha mantenido en condiciones controladas de temperatura (22±2 °C) y humedad (49±2%), con un ciclo diario de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (encendido 7:15 a.m., apagado 7:15 p.m.).

3.2. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO PARA LAS TÉCNICAS DE UNIÓN AL RECEPTOR

En los estudios en relación con el eje hipotálamo–hipófisis–adrenal (H–H–A), para eliminar las posibles influencias sobre la secreción de hormonas en relación con los ritmos circadianos, se sacrificaron todos los animales siempre entre las 8 a.m. y las 9 a.m.

3.2.1. RATON

3.2.1.1. HIPOCAMPOS

Los animales fueron decapitados en menos de 60 segundos, después de ser retirados del animalario, con objeto de evitar un aumento de hormonas en relación con un estrés por ambiente nuevo. Se extrajo el cerebro y los hipocampos fueron disecados sobre una placa con hielo en menos de 2 minutos, colocándose inmediatamente en tubos de centrifuga con medio líquido a 2°C. El medio líquido estaba compuesto por RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato sódico. (Flow Laboratories; Irvine, Scotland), al que se le añadió:

Gentamicina (Antibióticos S.A.):	50 µg/ml
HEPES (Boehringer Mannheim):	20 nM
Azida sódica (Sigma):	1 mg/ml
Aprotinina (Boehringer Mannheim):	100 U/ml
Bacitracina (Aldrich Quimica):	10 ⁻⁴ M

La solución se ajustó a pH 7.4 con un pH–metro CRISON modelo micropH 2000 y se mantuvo a 4°C. Este medio se denominará de ahora en adelante RPMI–completo (RPMI–c).

En general se utilizó 1 hipocampo por tubo para los estudios de punto único y 7-8 hipocampos por tubo para los estudios de saturación. Para la preparación de membranas se siguió la técnica descrita por Takao y col (1990) con varias modificaciones. Los hipocampos se homogenizaron, inicialmente, en un homogenizador de vidrio y teflon (Heidolf RZR 1, Alemania) con 20 pases a 600 rpm. Posteriormente se utilizó un homogenizador de cuchillas (Ultraturrax T25, Alemania) a una velocidad de 20.000 g durante 6 segundos. El cambio se realizó tras comprobar que no afectaba a los resultados de los ensayos de unión al receptor y en función de una mayor rapidez del segundo método. Seguidamente, los homogenizados se centrifugaron durante 12 minutos a 20.000 g a una temperatura de 4°C (Centrífuga Sorval RC5C, Du Pont U.S.A.). El sobrenadante se desechó, resuspendiéndose el precipitado en RPMI fresco y centrifugándose una segunda vez en las mismas condiciones. Por fin, se decantó el sobrenadante, congelándose el precipitado a -70°C, hasta los estudios de unión al receptor.

3.2.1.2. HIPOTALAMOS

Tras la extracción del cerebro de la cavidad craneana, se colocó sobre una placa con hielo seco disecándose el bloque hipotalámico siguiendo los siguientes límites: el borde posterior del quiasma óptico, el borde anterior de los cuerpos mamilares, los surcos hipotalámicos laterales y el borde ventral del tálamo (2 mm de profundidad). Se colocaron 3 ó 7 hipotálamos por tubo para alcanzar una concentración adecuada de proteínas. El proceso para separar las membranas fue similar al descrito para los hipocampos.

3.2.2. RATA

En la rata, las membranas se prepararon siguiendo dos protocolos distintos. El primero de ellos fue similar al utilizado en ratones (ver epígrafe 3.2.1.1.). En el segundo se utilizaron dos centrifugaciones previas a bajas revoluciones, con la intención de eliminar las partes más pesadas (nucleos, mitocondrias, etc.) tratando de disminuir al máximo la unión no específica. Una vez homogenizado el hipocampo de forma similar a la descrita para ratones, se centrifugó durante 10 minutos a 1000 g. El sobrenadante (S1) se reservó y el precipitado resultante se resuspendió en RPMI-c y se volvió a centrifugar a 1000 g durante 10 minutos. El sobrenadante resultante de esta segunda centrifugación (S2) se unió al resultante de la primera centrifugación (S1), desechándose el precipitado restante. S1 y S2 se juntaron y fueron centrifugados dos veces a alta velocidad (20.000 g), según lo descrito en el apartado 3.2.1.1., y el precipitado resultante se congeló hasta los estudios de unión la receptor.

3.3. TECNICA DE UNION AL RECEPTOR

Se siguió la técnica descrita por Takao y col (1990) con algunas modificaciones. Una vez descongelados los precipitados de membranas, se añadieron 3 ml de medio RPMI-c y se calculó la concentración de proteínas usando un kit comercial de proteínas (BCA Protein Assay Reagent PIERCE, Rockford IL, USA). La lectura se realizó mediante un contador para ELISA (Multiscan). Seguidamente se ajustaron las proteínas a la concentración final deseada (300-400 μ g/tubo o 133 mg/ml en la mayoría de los experimentos) añadiendo RPMI-c.

Para calcular el *unión total* (TB) se añadieron en tubos Eppendorf 100 μ l de medio de incubación (MI) compuesto por RPMI-c al que se le añadió albúmina sérica bovina (Sigma, St Louis MO, USA) al 0.15%. Para el cálculo de la *unión no-específica* (NSB) se sustituyó el MI por 100 μ l de IL-1 α fría a una concentración saturante de 100 nM (33 nM concentración final) disuelta en el propio MI. Tanto a los tubos para el TB, como los tubos para el NSB se les añadió 100 μ l de IL-1 marcada con 125 I a una concentración de 150 pM (50 pM concentración final) en los estudios de punto único y de 600 a 4 pM (200 a 1.7 pM concentración final) en los estudios de saturación. Finalmente a todos los tubos Eppendorf se les añadieron 100 μ l de la solución conteniendo la membranas, ya ajustada a la concentración final de proteínas deseada (300–400 μ g/tube o 100–133 mg/ml). Se permitió que la reacción alcanzase su equilibrio durante 3 horas a temperatura ambiente, tiempo tras el que se detuvo la incubación mediante centrifugación a 12.000 g durante 5 min, a 4°C con una centrífuga Beckman (Microfuge-11, Beckman Instruments, Inc., U.S.A.). Se decantó el sobrenadante resuspendiéndose el precipitado en medio Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (Sigma St Louis MO, USA), al que se le añadió Triton X-100 (Panreac, Barcelona, España) al 0.01% mantenido a 4°C y recentrifugándose una segunda vez a 12.000 g durante 5 minutos y a 4°C. El sobrenadante fue aspirado y la radioactividad del precipitado resultante fue medida en un contador-gamma (Wallac, Turku, Finlandia) con un 75% de eficacia. Todos los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado.

3.4. CITOCINAS

Para los experimentos se usaron las siguientes citocinas:

* Interleucina-1 α recombinante humana marcada con ^{125}I (NEN Research products, Du Pont, Dreieich, Alemania): Actividad específica entre 75.8–107 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ según el lote.

* Interleucina-1 β recombinante humana marcada según el método de Bolton–Hunter con ^{125}I (NEN Research products, Du Pont, Dreieich, Alemania). Actividad específica: 125 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

* Interleucina-1 β recombinante murina marcada según el método de Bolton–Hunter con ^{125}I (NEN Research products, Du Pont, Dreieich, Alemania). Actividad específica: 115 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

* Interleucina-1 α recombinante humana sin marcar (Hoffmann La Roche, Nutley, New Jersey, U.S.A.), cedida generosamente por el Dr. Peter Lomedico.

* Interleucina-1 β recombinante humana sin marcar (Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, U.S.A.).

La molaridad en la que expresamos la concentración de las citocinas en los diferentes experimentos fue calculada en base a la referencia de la actividad específica de cada citocina.

3.5. TRATAMIENTOS "IN VIVO"

Para los tratamientos *in vivo* se utilizaron diferentes sustancias que fueron administradas a los animales por vía intraperitoneal.

3.5.1. TRATAMIENTO CON LIPOPOLISACARIDOS BACTERIANOS (LPS)

Los animales recibieron inyecciones por vía intraperitoneal (i.p.) de LPS de *E. Coli* del serotipo 026:B6 (Sigma St. Louis MO, USA) disuelto en solución salina estéril en dosis de 30 μ g/animal/12horas administrandose las dosis a las 8 a.m. y a las 8 p.m. El volumen inyectado fue de 300 μ l. Los controles recibieron una inyección de solución salina estéril de volumen equivalente.

3.5.2. TRATAMIENTO CON DEXAMETASONA

Se usaron tres pautas de administración distintas: aguda, subcrónica y crónica. La administración se realizó mediante inyecciones i.p. de una solución de dexametasona (Fluka Ag Buchs Suiza) en suero salino con etanol al 2–4%, en una única inyección (administración aguda), en 5 dosis separadas por 12 horas (administración subcrónica) y en 18 dosis separadas igualmente por 12 horas cada una (administración crónica). Las inyecciones se realizaron siempre a las 8 a.m. y a las 8 p.m.

Según cual fuese el experimento se usaron dos dosis distintas: 0.25 mg/kg peso (dosis baja) y 1 mg/kg (dosis alta). Los animales control recibieron inyecciones de salino y etanol al 2–4% del mismo volumen. La dilución se ajustó para inyectar 200 μ l por cada 20 gr de peso del animal.

3.5.3. TRATAMIENTO CON CORTICOSTERONA

3.5.3.1. Tratamiento vía i.p.

Como con la dexametasona, para la corticosterona (Sigma, St. Louis MI, USA) se usaron pautas de administración aguda, subcrónica y crónica (1, 5 y 18 dosis respectivamente) inyectándose vía i.p. a las 8 a.m. y a las 8 p.m. Se usaron del mismo modo dos dosis distintas que fueron de 1,25 mg/kg (dosis baja) y 5 mg/kg (dosis alta) disueltas igualmente en solución salina estéril con etanol al 2–4%. La dilución se ajustó para inyectar 200 μ l por cada 20 gr de peso del animal.

3.5.3.2. Tratamiento mediante implantes subcutaneos de liberación continuada

Además, en un experimento aislado, se usaron implantes subcutaneos de corticosterona de liberación continuada (*Corticosterone pellets*, Innovative Research of America, Toledo Ohio, USA) implantados subcutáneamente. Estos implantes contienen 35 mg de corticosterona y la liberan aproximadamente a una dosis de 70 μ g/hora, produciendo niveles en sangre similares a los observados en plasma en situaciones de estrés. Este método tiene la ventaja, al contrario que las inyecciones i.p., de evitar el estrés repetido que sufren los animales con cada inyección y de mantener los niveles de corticosterona constantes en sangre. Los implantes fueron colocados bajo anestesia con Pentobarbital sódico (Normon, Madrid) a una dosis de 50 mg/kg. Se realizó una incisión en la línea media dorsal de unos 5–7 mm de longitud, abriéndose posteriormente con un separador un pequeño "bolsillo" subcutáneo lateral de unos 1–1.5 cm. de profundidad en cuyo fondo se colocó el implante. En los animales control se realizó la misma intervención, pero no se colocó implante alguno. Los implantes subcutaneos se mantuvieron durante 8 días tras los cuales los animales fueron sacrificados.

3.6. TRATAMIENTOS "IN VITRO"

3.6.1. TRATAMIENTOS "IN VITRO" EN HOMOGENIZADOS DE MEMBRANAS

En los experimentos en los que se usaron homogenizados de membrana, estas fueron procesadas según las técnicas ya descritas anteriormente. Se usaron 24 animales y se juntaron los hipocampos de 6 animales para para obtener un n=4 para cada grupo de tratamiento (DEX, CORT, SAL) y dosis (DEX 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M y CORT 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M). Una vez obtenido el precipitado final (ver apartado 3.2.1.1.), este fue nuevamente resuspendido en RPMI y se ajustó a una concentración de $400\mu\text{g}$ de proteínas/tubo ($133\mu\text{g/ml}$ concentración final) añadiéndose $100\mu\text{l}$ de la dilución de membranas a los tubos Eppendorf que contenían la [^{125}I]rhIL-1 α (50 pM concentración final) y rhIL-1 α fría (33 nM concentración final). Los tubos se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente en presencia de concentraciones de 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-4} M de DEX o de las tres primeras concentraciones de CORT en diluciones preparadas con salino y etanol al 2-4%. Las diluciones se ajustaron para añadir $10\mu\text{l}$ a cada tubo de incubación. Los controles se incubaron con un volumen y dilución similar de salino con etanol. Tras la incubación los tubos Eppendorf se centrifugaron y procesaron de un modo similar a lo descrito en el apartado 3.3.

3.6.2. TRATAMIENTOS "IN VITRO" EN RODAJAS DE HIPOCAMPO

Para los tratamientos *in vitro* en los que se usaron rodajas del tejido para la incubación, se decapitaron los animales, extrayéndose el cerebro rápidamente y disecándose el hipocampo sobre una placa metálica sobre hielo. Seguidamente el tejido fue colocado en medio Krebs-Ringer, sin cloruro cálcico ni bicarbonato

sódico (Sigma St Louis MI, USA) gaseado con O₂ a saturación, a 4°C y con el pH ajustado a 7.4. El tejido se cortó en láminas de 400 µm mediante un *laminador de tejido (tissue chopper)* (McIlwain, Washington, USA). Estas láminas fueron reintroducidas en 2 ml de medio Krebs–Ringer fresco y se incubaron con la sustancia a estudiar en un baño a 37°C con agitación suave durante 90 minutos.

Se realizaron incubaciones con DEX y CORT a concentraciones de 10⁻⁸, 10⁻⁶ y 10⁻⁴M en diluciones con salino y etanol al 2–4%, añadiéndose 100µl de estas diluciones a los tubos de incubación. Los controles recibieron salino con etanol en diluciones y volumen equivalente.

Tras la incubación se aspiró el medio Krebs–Ringer y se sustituyó por medio RPMI, homogenizándose y separándose seguidamente las membranas celulares según el protocolo descrito en el apartado 3.2.1.1.

3.7. TECNICAS QUIRURGICAS:

3.7.1. ADRENALECTOMIA (ADX)

Los animales fueron anestesiados con Pentobarbital sódico (Euta–Lender, Normon, Madrid, España) en dosis 50 mg/kg. Una vez anestesiado el animal se rasuró y desinfectó el area de la intervención. Con el animal en decúbito ventral se realizó una incisión medial en la piel de unos 15 a 20 mm cuyo borde superior se situaba aproximadamente sobre la primera vértebra lumbar. La piel se retiró con ayuda de pequeños separadores, realizandose seguidamente una incisión longitudinal en la musculatura lumbar a ambos lados de la columna vertebral, ampliandose dicha incisión con un separador hasta alcanzar la cavidad

retroperitoneal y visualizar los riñones. Tras localizar la glandula adrenal se extirpó la misma con ayuda de unas pinzas, así como el tejido adiposo circundante. Seguidamente se suturó la pared muscular con *catgut* a ambos lados, cerrándose la piel con seda. En los animales control se realizó una intervención quirúrgica idéntica, salvo que no se extirparon las glándulas adrenales.

Los animales ADX recibieron además de agua y comida, suero salino fisiológico para beber *ad libitum*.

3.7.2. INYECCIONES INTRACEREBRALES

Tras anestesiar al animal con eter dietílico (Panreac, España), se le inyectó por medio de una jeringuilla con una aguja de 25 G, 30 μ l de una suspensión de virus de Theiler en medio *Dulbecco's modified Eagles medium* (DMEM) con 4,5 gr de glucosa por litro (Bio-Whittaker, Verviers, Bélgica), glutamina 200mM (Flow, Nuclear Ibérica, Madrid) y 10% de suero de ternera fetal. La inyección se realizó sobre el hemicráneo derecho en un punto intermedio entre el pabellón auricular y el globo ocular y a 4 mm lateralizado respecto a la linea media. La profundidad una vez se perforaba el craneo se controló por un tope mecánico situado a 1.5 mm de la punta de la aguja.

En los animales control se realizó la misma intervención inyectándose 30 μ l de medio DMEM, sin virus.

3.8. MODELOS DE APLICACION DE ESTRES

Para evaluar el efecto de la corticosterona endógena sobre la unión de la IL-1 a su receptor se usaron cuatro modalidades distintas de aplicación de estrés:

3.8.1. ESTRES ACUSTICO

Se usó una cámara insonorizada con dos altavoces laterales a través de los cuales recibían desde un generador acústico (Cibertek, Madrid, España) un sonido intermitente de 500 Hz de frecuencia y 110 db de intensidad en trenes de 15 segundos (5 seg. *on*, 10 seg *off*) durante un tiempo total de 15 min. Todos los animales fueron sometidos a una sesión de estrés diaria durante 5 días y fueron sacrificados 1 hora después de la última sesión.

3.8.2. CHOQUE ELECTRICO INESCAPABLE

Se usó una caja de evitación activa adaptada para ratones a cuya rejilla se le suministró, desde un generador de corriente continua (Cibertek, Madrid, España), un choque eléctrico de 0.5 mA de intensidad. Se administraron 75 choques de modo intermitente, de 1 segundo de duración, intercalándose una pausa de 11 seg entre un choque y otro. La duración total de cada sesión fue de 15 minutos y se aplicó una sesión diaria durante 5 días consecutivos. Los animales fueron sacrificados una hora después de la última sesión.

3.8.3. ESTRES TERMICO (Exposición al frío)

Los animales fueron introducidos en una cámara fría (4°C) en jaulas individuales, sin comida ni bebida por un periodo de una hora (de 9 a.m. a 10 a.m.) durante 5 días consecutivos. Los animales fueron sacrificados 1 hora después de la última sesión.

Como controles para los grupos 3.8.1., 3.8.2. y 3.8.3. se usaron animales de la misma edad y peso mantenidos en el estabulario en condiciones habituales.

3.8.4. TECNICAS DE MANIPULACION NEONATAL (HANDLING)

Se realizó en ratones BALB/c, comenzandose el mismo día del parto de la camada. Los ratones recién nacidos fueron retirados durante 15 minutos de su jaula habitual y situados en una nueva jaula. La madre permaneció en la jaula habitual. Este procedimiento se realizó 1 vez al día durante 21 días consecutivos, tras los cuales los animales fueron separados en diferentes jaulas según sexos y grupos. Los animales control permanecieron en una misma jaula los 21 días, siendo movilizados unicamente 1 vez por semana para cambiar el serrín. Todos los grupos fueron sacrificados a las 13 semanas de edad.

3.9. ENCEFALOMIELITIS POR EL VIRUS DE THEILER (TMEV)

3.9.1. INDUCCION Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD

Se usó un virus de Theiler de la cepa DA, cedido generosamente por el Dr. Raymond D. Roos (Universidad de Chicago). Esta cepa había sido obtenida por

transfección de un clon infeccioso a células L929 con purificación en placa. Posteriormente, los virus recibieron cuatro pases por células BHK-21.

La dosis inyectada estuvo en el rango de 1×10^7 a 1×10^8 pfu/ml en DMEM con 4,5 g/l de glucosa, glutamina 200mM y suero de ternera fetal al 5%. El volumen inyectado fue de 30 μ l. La técnica usada está detallada en el apartado 3.5.2.

Tras la intervención los animales fueron examinados clínicamente tres veces por semana el primer mes y, en los experimentos en los que se mantuvo al animal vivo por más tiempo, dos veces por semana en los meses siguientes. La severidad de la afectación clínica se clasificó en cuatro grados diferentes:

- Grado 0: No hay afectación clínica
- Grado 1: Hipotonía de la cola
- Grado 2: Paraparesia leve-moderada
- Grado 3: Paraparesia severa con pérdida del control esfinteriano

3.9.2. TRATAMIENTOS EN LA ENCEFALOMIELITIS POR TMEV

3.9.2.1. Dexametasona

En algunos experimentos los animales recibieron tratamiento con DEX a una dosis de 0.5 mg/kg/12horas por vía i.p. diluida en salino con etanol al 2-4%, una vez habían sido infectados con el virus. Se inyectó un volumen de 200 μ l/20gr de ratón. Los controles recibieron salino con etanol en diluciones y volumen equivalentes. El tratamiento se comenzó al quinto día post-infección y se mantuvo hasta el sacrificio.

3.10. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS

Los datos se analizaron mediante un paquete estadístico para ordenadores personales CRUNCH. Para detectar los posibles efectos de los tratamientos en los diferentes grupos se usó el análisis de la varianza (ANOVA). Cuando se requirió, las variaciones entre los grupos individuales se analizaron mediante un test post-hoc Tukey B. Para la comparación de las medias entre dos grupos distintos se realizó el análisis a través de la T de Student. Los estudios de saturación y los Scatchard se analizaron mediante un programa Ligand (Munson y Robards, 1987). Se admitió que existía significación estadística con valores de $p < 0.05$.

4.- RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1. PUESTA A PUNTO DEL METODO DE UNION AL RECEPTOR EN HIPOCAMPO

Recientemente se ha descrito un receptor específico para IL-1 en el sistema nervioso central (SNC) de diferentes especies animales. Dicho receptor, como ha quedado expuesto en la introducción de este trabajo, ha sido estudiado fundamentalmente por medio de técnicas de unión al receptor y por autorradiografía.

Nosotros decidimos estudiar la regulación de dicho receptor utilizando para ello técnicas de unión al receptor. Mediante varios experimentos previos estudiamos las mejores condiciones del ensayo en nuestro caso.

VARIACIONES EN LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1 EN RELACION CON DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES

4.1.1. RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS Y LA UNION AL RECEPTOR DE rhIL-1

En experimentos previos se analizó la influencia de la concentración de proteínas sobre la capacidad de unión de la IL-1 a su receptor. La Fig. 4.1. muestra los valores de unión total (TB), unión no-específica (NSB) y unión específica (SB) en relación con una concentración creciente de proteínas. Se usaron concentraciones de 645, 500, 400, 300, y 100 μg de proteína/tubo (215, 166, 133, 100, 33 μg de proteína/ml), obtenidas por diluciones a partir de los

hipocampos de dos animales procesados conjuntamente. El porcentaje de SB fue aumentando en relación con el NSB desde concentraciones de 100 $\mu\text{g}/\text{tubo}$ hasta 400–500 $\mu\text{g}/\text{tubo}$, donde el SB representaba aproximadamente el 50% del TB. El incremento de la concentración de proteínas por encima de estas cifras no mejoró los valores de SB. Dado que la concentración de proteínas obtenidas de los hipocampos de un raton BALB/c adulto está entre 400 y 600 $\mu\text{g}/\text{tubo}$, se decidió usar esta concentración, que permitía usar un único animal por punto y con la que obteníamos un porcentaje óptimo de SB.

4.1.2. RELACION ENTRE EL TIEMPO DE INCUBACION Y LA UNION AL RECEPTOR DE *rhIL-1 α*

Seguidamente se estudió la relación entre el tiempo de incubación y la unión al receptor de IL-1 α . La fig. 4.2. muestra los resultados utilizando diferentes tiempos de incubación en relación con el porcentaje de SB para IL-1 α . Se estudiaron tiempos de incubación de 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 12 horas a temperatura ambiente. El SB ascendió inicialmente hasta obtenerse un porcentaje máximo de SB a las 3 horas de incubación que equivaldría al 40–60% del TB. A partir de este momento la reacción se mantendría en equilibrio.

4.1.3. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA UNION AL RECEPTOR DE *rhIL-1 α*

La Fig. 4.2. muestra también el efecto de la temperatura sobre la unión al receptor de IL-1 α . A 4°C, el SB ascendía desde las 12 horas de incubación hasta alcanzar una meseta a las 18 ó 24 horas correspondiendo a un 52–53% del TB. Dado que este valor no era superior al obtenido tras 3 horas de incubación a

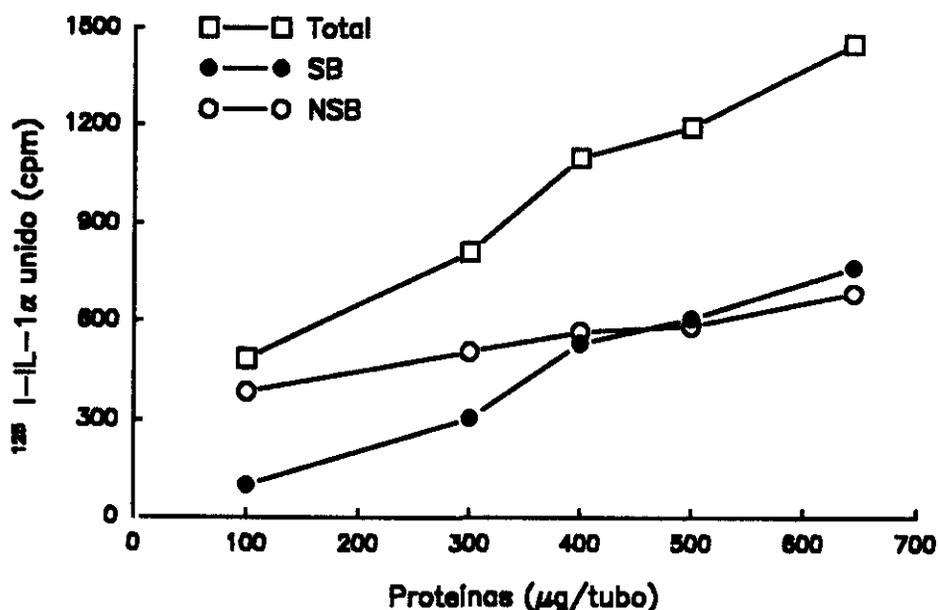


Fig. 4.1.: Variaciones en la unión al receptor de IL-1 (IL-1R) de la [^{125}I]rhIL-1 α en función de concentraciones crecientes de proteínas procedentes de membranas de hipocampo de ratón BALB/c macho. Se realizó una incubación de 3 horas a temperatura ambiente. Las proteínas se obtuvieron por diluciones sucesivas a partir de los hipocampos de 2 animales. Se muestran los resultados de un experimento significativo.

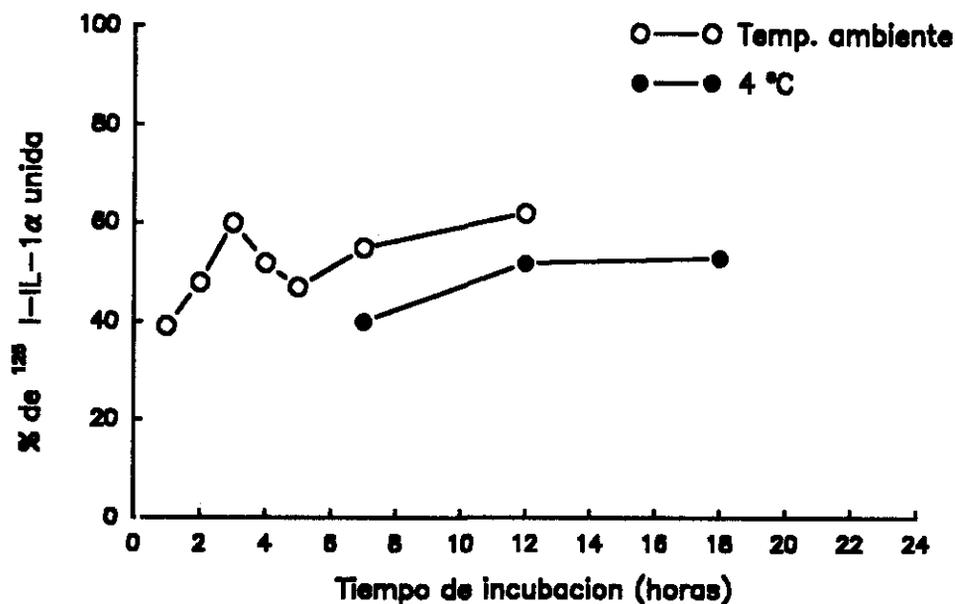


Fig 4.2.: Variaciones en la unión al IL-1R de la [^{125}I]rhIL-1 α en función del tiempo de incubación y la temperatura, en membranas de hipocampo de ratón BALB/c macho. Se usó una concentración constante de proteínas de 133 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (400 $\mu\text{g}/\text{tubo}$). Se muestra igualmente un experimento significativo.

temperatura ambiente, decidimos usar estas condiciones.

En subsiguientes experimentos se correlacionaron tiempo de incubación, concentración de proteínas y temperatura. Variaciones en la concentración de proteínas a distintas temperaturas (T.A. y 4°C) y a diferentes tiempos de incubación (3 y 20 horas) no mejoraron los resultados del SB.

4.1.4. UNION AL RECEPTOR DE *rhIL-1 α* EN DISTINTAS CEPAS DE RATONES

La tabla 4.1. muestra los diferentes valores de SB en las cepas BALB/c, SWISS, C3H ,SJL/J y C57/BL6. Los resultados muestran que los valores de SB para todas las cepas es similar y abarcó valores desde 48.4% a 55.6%. El análisis estadístico de los difentes grupos no reveló diferencias estadísticas significativas. Por el fácil acceso a los ratones BALB/c y su menor coste económico (se crían en el propio Instituto Cajal) decidimos usar esta cepa en nuestro estudio.

4.1.5. UNION AL RECEPTOR DE *rhIL-1 α* EN RATONES BALB/c MACHOS Y HEMBRAS

La fig. 4.4. muestra los valores de SB en ratones BALB/c machos y hembras. No existen diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, para evitar posibles interferencias en relación con los diferentes estadios del ciclo menstrual se decidió trabajar, fundamentalmente, con machos.

TABLA 4.1.: UNION AL RECEPTOR DE IL-1 DE LA rhIL-1 α EN LAS DISTINTAS CEPAS DE RATON

CEPA	SB (cpm)*	% SB*	[Prot]	n
BALB/c	1040.8 \pm 53.4	50.40 \pm 1.53	400	4
SWISS	1157.0 \pm 137.6	55.62 \pm 3.08	400	4
C3H	942.0 \pm 246.0	55.09 \pm 14.0	400	2
SJL/L	1329.7 \pm 78.4	48.42 \pm 2.85	400	4
C57/BL6	1102.4 \pm 98.4	51.38 \pm 1.09	400	5

* Los resultados se expresan como la media \pm error estandar (S.E.M.)

VARIACIONES EN LA UNIÓN AL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOCAMPO DE RATÓN EN RELACIÓN CON EL USO DE DISTINTAS CITOCINAS

4.1.6. UNIÓN AL RECEPTOR DE *rhIL-1 β* EN RATÓN BALB/c

Se estudió seguidamente la unión al receptor de *rhIL-1 β* en ratón BALB/c. Los animales se procesaron de un modo similar a los experimentos anteriores usándose una concentración de *IL-1 β* de 150 pM. Se obtuvo un porcentaje de SB de 44.85 ± 6.75 (media \pm S.E.M., n=4). Sin embargo, la afinidad del receptor por la *rhIL-1 β* , calculada en función del número de cpm unidas al receptor (SB) dividido por el número total de cuentas del ligando radioactivo (150 pM) añadidas para la incubación (TC), fue unas 6.5 veces menor, que para la *rhIL-1 α* .

4.1.7. UNIÓN AL RECEPTOR DE *rmIL-1 β* EN RATÓN BALB/c

Finalmente, estudiamos si la capacidad de unión de la *IL-1 β* podía mejorarse usando una *IL-1* de origen murino (*rmIL-1*) en vez de una *IL-1* recombinante humana. Para ello, estudiamos la unión al receptor de *rmIL-1 β* a una concentración de 150 pM en condiciones idénticas a las usadas hasta ahora. El porcentaje de SB obtenido fue de 52.75 ± 3.57 (media \pm S.E.M., n=4). La comparación de los resultados obtenidos con *rhIL-1 β* y *rmIL-1 β* no mostró diferencias significativas. De modo similar a lo que ocurría con la *rhIL-1 α* en relación con la *rhIL-1 β* , la *rmIL-1 β* tuvo una afinidad 1,4 veces menor que la *rhIL-1 α* .

Unión al receptor de IL-1 de la rhIL-1 α en ratones BALB/c machos y hembras

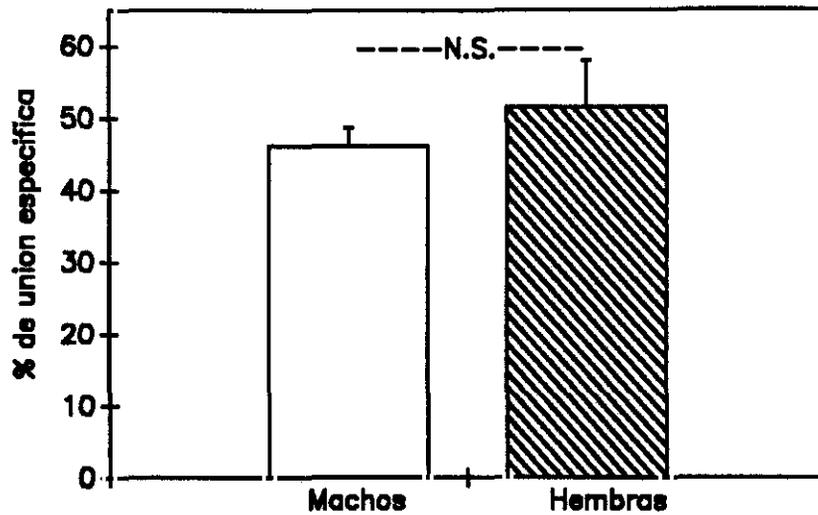


Fig. 4.3.: Porcentaje de unión específica al receptor de IL-1 en ratones BALB/c machos y hembras. Valores para una concentración de 150 pM de [¹²⁵I]rhIL-1 α : Machos 46.13 \pm 2.54 (media \pm S.E.M.); Hembras 51.5 \pm 6.5; n=3. T-test: p=0.43

Unión de la rmIL-1 β y rhIL-1 β al IL-1R en ratones BALB/c machos

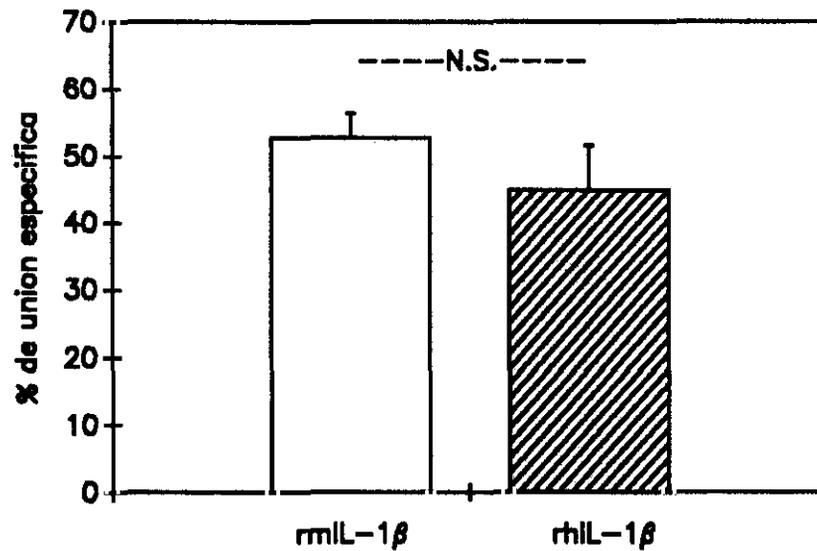


Fig 4.4.: Porcentaje de unión específica al receptor en ratones BALB/c machos. Valores para rmIL-1 β a una concentración de 150pM: SB 52.75 \pm 3.57 (media \pm S.E.M.), n=4. Valores para rhIL-1 β a una concentración de 150 pM: SB 44.85 \pm 6.75 (media \pm S.E.M), n=4. T-Test: 0.61

4.1.8. UNION AL RECEPTOR DE IL-1 EN RATA

4.1.8.1. UNION AL RECEPTOR DE rhIL-1 α EN RATA WISTAR

Se estudió la unión al receptor de IL-1 α en rata Wistar macho. En un primer experimento, los hipocampos se procesaron del modo habitual descrito para ratones y en un segundo experimento se realizaron dos centrifugaciones previas a baja velocidad para tratar de obtener un precipitado de membranas de mayor pureza. Se realizaron incubaciones a 3 y 18 horas y a concentraciones de 100 y 300 pM de [125I]IL-1 α , todas a temperatura ambiente. En el experimento realizado con centrifugación previa y a 3 horas de incubación se obtuvieron unas porcentajes de SB muy bajos. En las demás condiciones no hubo SB alguno.

4.1.8.2. UNION AL RECEPTOR DE rhIL-1 β EN RATA WISTAR

Dado que utilizando IL-1 α en rata no se obtuvieron porcentajes de unión al receptor significativos, decidimos utilizar como ligando la IL-1 β a diferentes concentraciones. Se realizaron varios experimentos usando [125I]rhIL-1 β (150 y 300 pM) en incubaciones a temperatura ambiente durante 3 horas. Los porcentajes de unión específica obtenidos fueron muy bajos en cualquiera de las condiciones.

4.1.8.3. UNION AL RECEPTOR DE rmIL-1 β EN RATA WISTAR

Finalmente, realizamos el ensayo de unión al receptor utilizando IL-1 recombinante murina en el hipocampo de ratas Wistar, por si dicho receptor en la rata fuese altamente específico. Para ello se utilizaron hipocampos de rata Wistar macho que fueron procesados con y sin centrifugación previa e incubados a T.A.

(3 horas) y a 37°C (2 horas). Únicamente en rata Wistar incubándose a T.A. durante 3 horas se obtuvo cierto porcentaje de SB, que fue del 11.6% para los animales procesados sin centrifugación previa y de 8.3% para aquellos animales procesados con una centrifugación previa. Un resumen de todos estos datos se presenta en la tabla 4.2.

Estos resultados y la coincidencia con la literatura que no encuentra unión al receptor con IL-1 α en rata nos hicieron desistir de usar este animal para los subsiguientes estudios.

4.2. UNIÓN AL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOTÁLAMO

Tras estudiar la unión al receptor de IL-1 en hipocampo se decidió analizar si existía unión en nuestras condiciones en el hipotálamo. Sin embargo, la concentración de proteínas en el hipotálamo de ratón era demasiado pequeña como para utilizar un único animal para cada punto, por lo que incluimos los hipotálamos de varios animales con tratamientos iguales, hasta obtener concentraciones de proteínas de aproximadamente 400 $\mu\text{g}/\text{tubo}$ (133 $\mu\text{g}/\text{ml}$), comparables con las obtenidas en los estudios de hipocampo.

Se usaron 3 y 7 hipotálamos por punto, con concentraciones de 437 $\mu\text{g}/\text{tubo}$ y 880 $\mu\text{g}/\text{tubo}$ respectivamente, y un tiempo de incubación de 3 horas a T.A. Con una concentración de 437 $\mu\text{g}/\text{tubo}$ (3 hipotálamos) se obtuvo un 16.2% de SB y con concentraciones de 880 $\mu\text{g}/\text{tubo}$ un porcentaje del 8.6%. Los bajos porcentajes observados nos llevaron a desechar este método como sistema para estudiar el receptor de IL-1 en el hipotálamo.

TABLA 4.2.: UNION ESPECIFICA AL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOCAMPO DE RATA WISTAR MACHO USANDO DIFERENTES IL-1 COMO LIGANDO RADIOACTIVO

	SB*	n
[¹²⁵ I]rhIL-1 α	14.1 \pm 7.9%	2
[¹²⁵ I]rhIL-1 β	15.4 \pm 3.2%	3
[¹²⁵ I]rmIL-1 β	10.0 \pm 1.7%	2

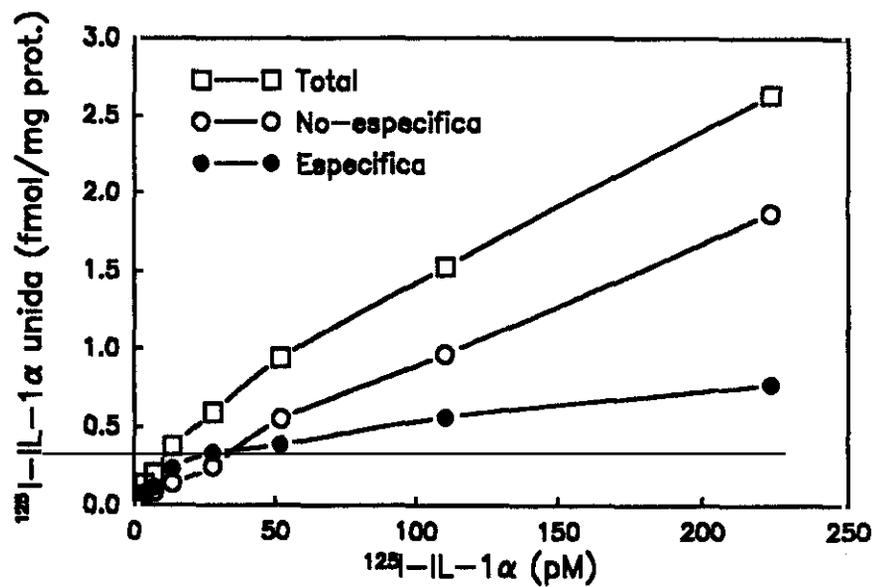
* La incubación se realizó durante 3 horas a temperatura ambiente y con una concentración de ligando de 300pM. Incubaciones con concentraciones menores de ligando y tiempos diferentes dieron cifras de SB aun menores (ver texto)

4.3. CARACTERIZACION Y CINETICA DEL RECEPTOR DE IL-1 EN EL HIPOCAMPO DE RATON BALB/c

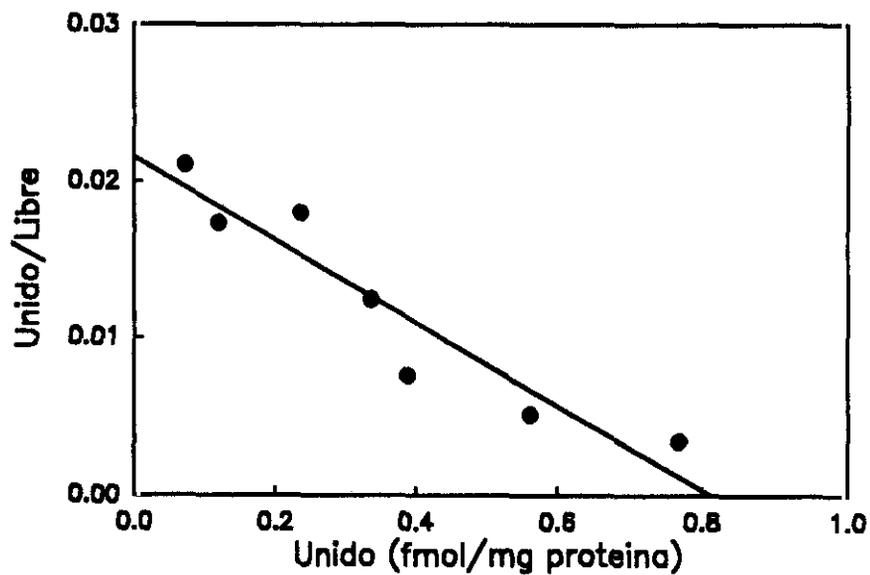
Para estudiar las características cinéticas del receptor de IL-1 se realizaron estudios de saturación en BALB/c machos y BALB/c hembras. La fig. 4.5. muestra la unión al receptor de $[^{125}I]IL-1\alpha$ en membranas de hipocampo de ratón macho, así como el Scatchard correspondiente y la fig. 4.6. muestra los mismos datos para ratones hembras. Ambas figuras recogen los resultados de un experimento representativo. En la tabla 4.3. se recogen los diferentes valores obtenidos en distintos experimentos realizados bajo condiciones similares para la unión máxima al receptor (B_{max}), equivalente al número de receptores de IL-1, y la constante de disociación (K_d) de esta reacción.

Los datos de las gráficas 4.5. y 4.6. muestran, que se trata de una reacción saturable a partir de concentraciones de ligando de alrededor de 50 pM, tanto en ratones machos como hembras. El análisis de la cinética para el receptor de IL-1 es compatible con la existencia de un único sitio de unión de alta afinidad con valores de B_{max} de 0.86 ± 0.06 fmol/mg de proteína y de la K_d de 24.78 ± 2.59 pM (media \pm SEM; n=3) en BALB/c machos. En hembras los valores fueron similares con un B_{max} de 1.17 ± 0.16 fmol/mg de proteína y una K_d de 32.85 ± 7.21 pM.

Estos resultados coinciden con los valores hallados por otros autores en el hipocampo de raton (Takao et al.,1990), que detectan un $Kd=114 \pm 35$ pM y un $Bmax=2.5 \pm 0.4$ fmol/mg proteína.

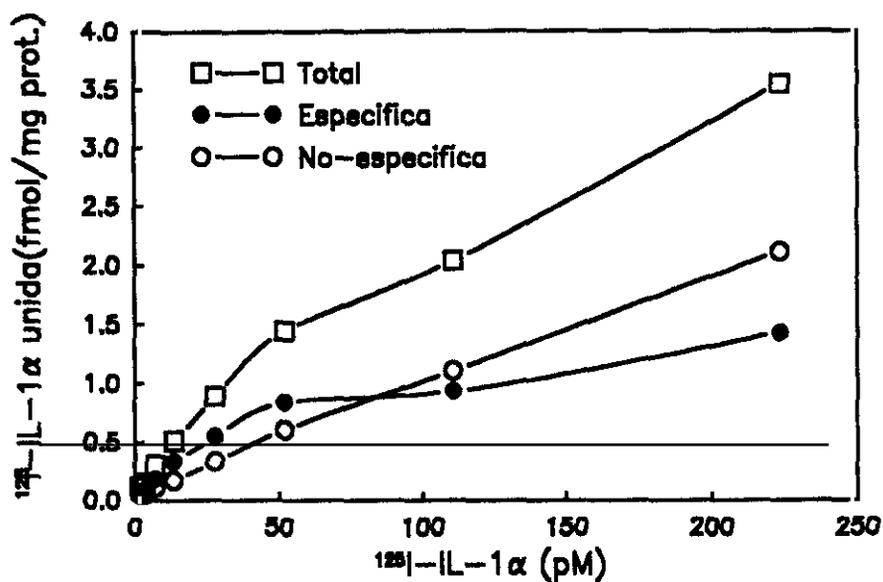


a.)

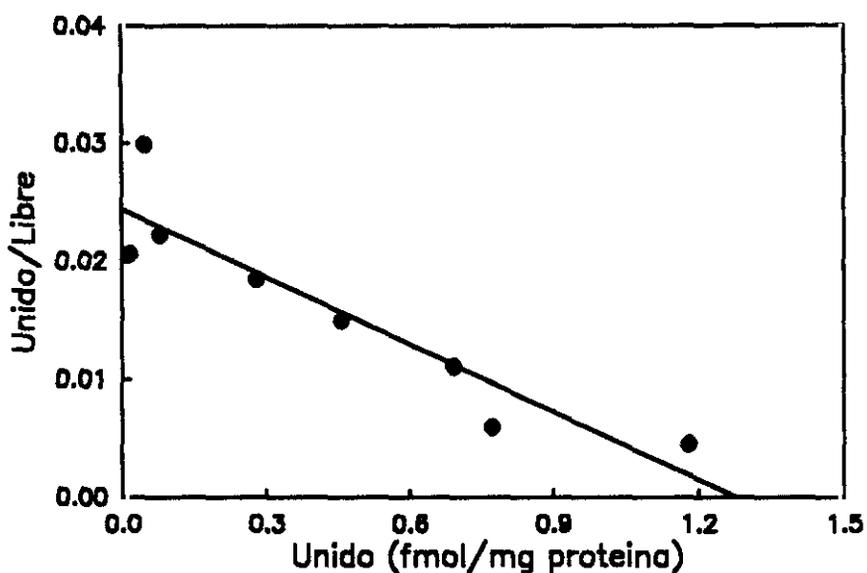


b.)

Fig. 4.5.: Saturación y cinética del receptor de IL-1 en el hipocampo de ratón BALB/c macho. Unión al receptor de IL-1 de [¹²⁵I]rhIL-1α (50 pM) en hipocampo de ratón BALB/c macho como función del incremento de ligando. a: En esta figura se muestran los valores totales de unión del ligando (total), de unión no-específica en presencia de una concentración de 33 nM de rhIL-1α fría y de unión específica obtenida restando el valor de la unión no-específica del valor de la unión total. b: Scatchard de la unión específica con [¹²⁵I]rhIL-1α en el hipocampo de BALB/c machos. Las membranas obtenidas por homogenización de los hipocampos fueron incubadas durante 3 horas a T.A. con concentraciones crecientes de [¹²⁵I]rhIL-1α. Los valores obtenidos en este experimento representativo fueron de B_{max} 0.81 fmol/mg proteína con un K_d de 37.75 pM.



a.)



b.)

Fig 4.6.: Saturación y cinética del receptor de IL-1 en el hipocampo de ratón BALB/c hembra. Unión al receptor de $[^{125}\text{I}]\text{rhIL-1}\alpha$ (50 pM) en hipocampo de ratón BALB/c hembra como función del incremento de ligando. a: Valores totales de unión total al ligando, unión no-específica (33 nM de rhIL-1 α) y unión específica. b: Scatchard de la unión específica con $[^{125}\text{I}]\text{rhIL-1}\alpha$ en BALB/c hembras. Las membranas obtenidas por homogenización de los hipocampos fueron incubados durante 3 horas a T.A. con concentraciones crecientes de $[^{125}\text{I}]\text{rhIL-1}\alpha$. Los valores obtenidos en este experimento representativo son de Bmax 1.25 fmol/mg proteína y Kd 49.41 pM.

**TABLA 4.3. CARACTERIZACION Y CINETICA DEL RECEPTOR DE IL-1.
VALORES MEDIOS PARA RATONES BALB/C MACHOS Y HEMBRAS.**

	<u>Machos</u>	<u>Hembras</u>
Bmax (fmol/mg prot.)	0.86 ± 0.06	1.17 ± 0.16
Kd (pM)	24.78 ± 2.59	32.85 ± 7.21

Los datos expresan la media ± S.E.M. de varios experimentos de saturación (Machos n=3, hembras n=2). En cada experimento se usaron los hipocampos de 7 animales.

4.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GLUCOCORTICOIDES EN LA UNION AL RECEPTOR DE rhIL-1 α EN HIPOCAMPO DE RATON BALB/c

Se estudiaron los efectos de la administración de un corticosteroide natural como corticosterona (CORT) y de un corticosteroide sintético como la dexametasona (DEX) sobre la capacidad de unión de la IL-1 a su receptor en el hipocampo de ratón. Se estudiaron diferentes tiempos y dosis.

4.4.1. EFECTOS DE LA ADMINISTRACION AGUDA DE CORTICOSTEROIDES SOBRE LA UNION AL RECEPTOR DE rhIL-1 α

La fig. 4.7. muestra los valores de unión al receptor para [¹²⁵I]rhIL-1 tras la administración tres horas antes del sacrificio de 1 única dosis de DEX (1 mg/kg) o CORT (5 mg/kg). Los animales fueron inyectados por vía i.p. y sacrificados 3 horas después de la administración del corticosteroide. Ni la DEX ni la CORT produjeron a estas dosis cambios significativos respecto a los animales control (SAL) inyectados con vehículo únicamente.

4.4.2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACION SUBCRONICA DE CORTICOSTEROIDES SOBRE LA UNION AL RECEPTOR DE rhIL-1 α

La fig. 4.8. muestra el efecto sobre la unión de la IL-1 sobre su receptor de la administración de DEX (0.25 mg/kg) y CORT (1.25 mg/kg). En este caso se siguió una pauta de administración subcrónica inyectándose a los animales cada 12 horas hasta un total de 5 dosis. Los animales que recibieron DEX presentaron un descenso en el valor de SB para rhIL-1 α del 20-24% respecto a los animales control. Por el contrario, la administración de CORT, con esta pauta y a estas

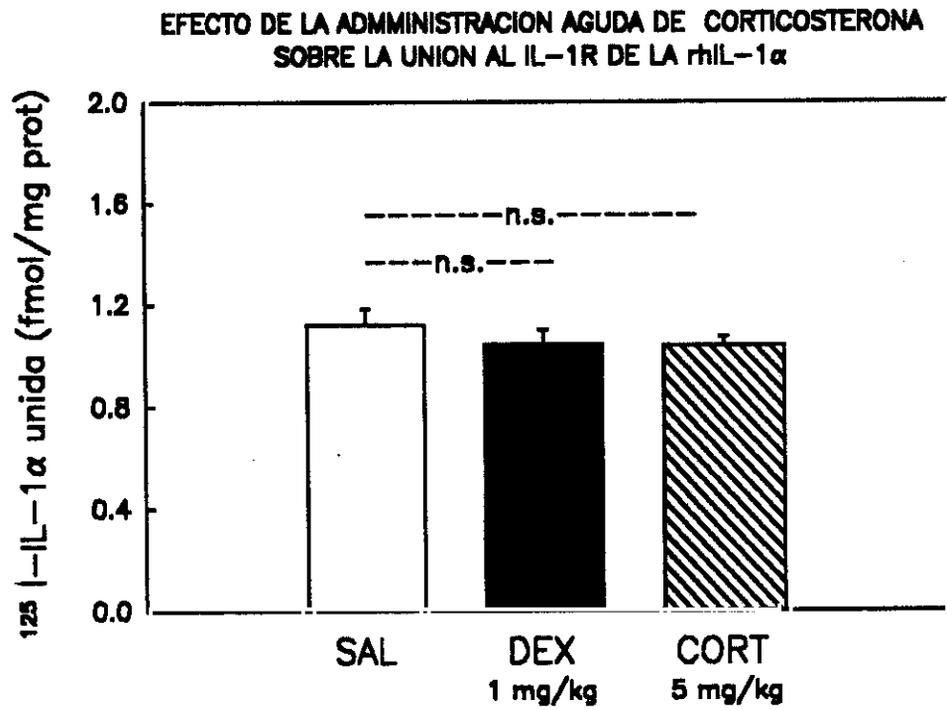


Fig. 4.7.: Unión al receptor de IL-1 de la [^{125}I]rhIL-1 α tras tratamiento con DEX y CORT en administración aguda en una única dosis (3 horas antes del sacrificio). Los porcentajes de unión específica fueron de SAL = 56.66 ± 1.60 (media \pm S.E.M., n=8), DEX = 53.34 ± 1.75 (n=8), CORT = 53.96 ± 1.09 (n=8). EL análisis de los grupos mediante ANOVA no detectó diferencias significativas entre los grupos ($p=0.27$).

dosis, no produjo variaciones respecto a los animales inyectados con salino estéril. Si bien el análisis a través de un análisis de la varianza (ANOVA) demostró una diferencia significativa entre los distintos grupos de tratamiento ($F_{2,17}=3.93$, $p<0.05$), el análisis post-hoc Tukey B no alcanzó significación estadística (DEX<SAL $p<0.1$, DEX<CORT $p<0.1$).

La fig. 4.9. muestra el efecto de utilizar dosis 4 veces mayores a la pauta anterior. Se inyectaron animales con DEX (1 mg/kg) y CORT (5 mg/kg), siguiendo el mismo esquema que en el grupo anterior, es decir 5 inyecciones con 12 horas de diferencia (8 a.m. y 8 p.m.) sacrificándose los animales 2 horas después de la última dosis. En este caso los corticosteroides disminuyeron la unión al receptor para rhIL-1 α en un 16% para los animales tratados con DEX y en un 14% para aquellos tratados con CORT. En ambos casos dicha reducción alcanzó significación estadística (ANOVA $F_{2,22}=5.78$, $p<0.01$; Tukey B test: DEX<SAL $p<0.05$; CORT<SAL $p<0.05$).

Para estudiar si dicha modulación podría incrementarse usando una IL-1 específica para el ratón, se utilizó en un experimento con diseño similar al experimento anterior sustituyéndose la IL-1 recombinante humana por una IL-1 de origen murino. La fig. 4.10. muestra los resultados sobre la unión al receptor de IL-1 de rmlIL-1 β tras la administración de 5 dosis i.p. de DEX (1 mg/kg) o CORT (5 mg/kg) administradas con intervalos de 12 horas y sacrificándose los animales 2 horas después de la última dosis. Como ocurría con la rhIL-1 α se obtuvo un descenso del 33.5% en el SB en los animales tratados con DEX frente a los tratados con SAL. No se observaron, sin embargo, diferencias en el grupo tratado con CORT (ANOVA $F_{2,10}=7.66$, $p<0.01$; Tukey B test: DEX<SAL $p<0.05$, DEX<CORT $p<0.05$).

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACION SUBCRONICA DE
CORTICOSTEROIDES SOBRE LA UNION AL IL-1R DE LA rhIL-1 α

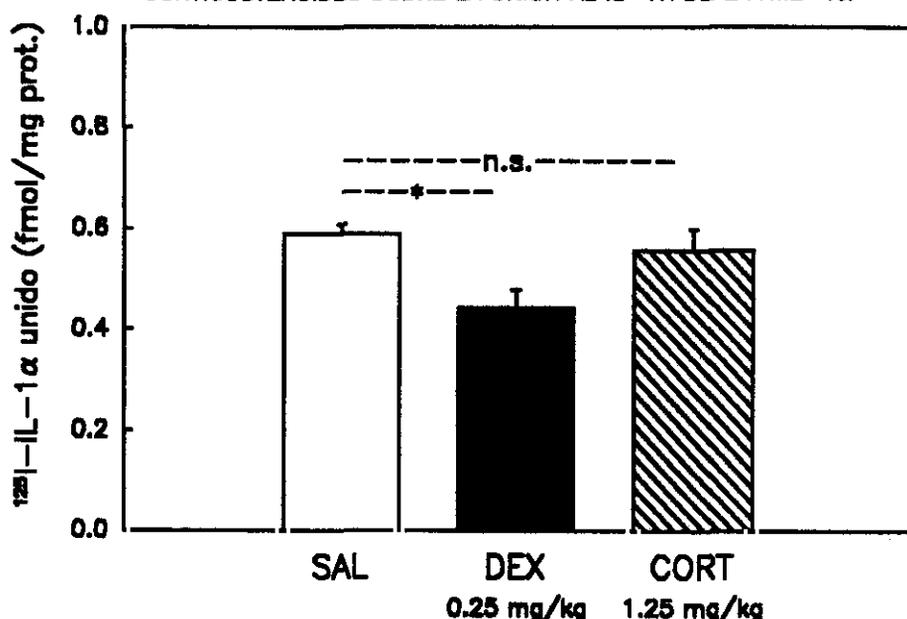


Fig 4.8.: Unión al receptor de [¹²⁵I]rhIL-1 α en ratones BALB/c machos tras tratamiento con DEX (0.25 mg/kg) o CORT (1.25 mg/kg) en administración subcrónica. Los animales recibieron 5 dosis de corticosteroides separadas a intervalos de 12 horas (8 a.m. y 8 p.m.) y fueron sacrificados 2 horas después de la última dosis. El tratamiento con DEX produjo un descenso del 24% de la unión específica al receptor. CORT no produjo cambios significativos. ANOVA: ($F_{2,17}=3.93$, $p<0.05$. Post-hoc Tukey B test DEX<SAL $p>0.1$, DEX<CORT $p<0.1$).

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACION SUBCRONICA DE
CORTICOSTEROIDES SOBRE LA UNION AL IL-1R DE LA rhIL-1 α

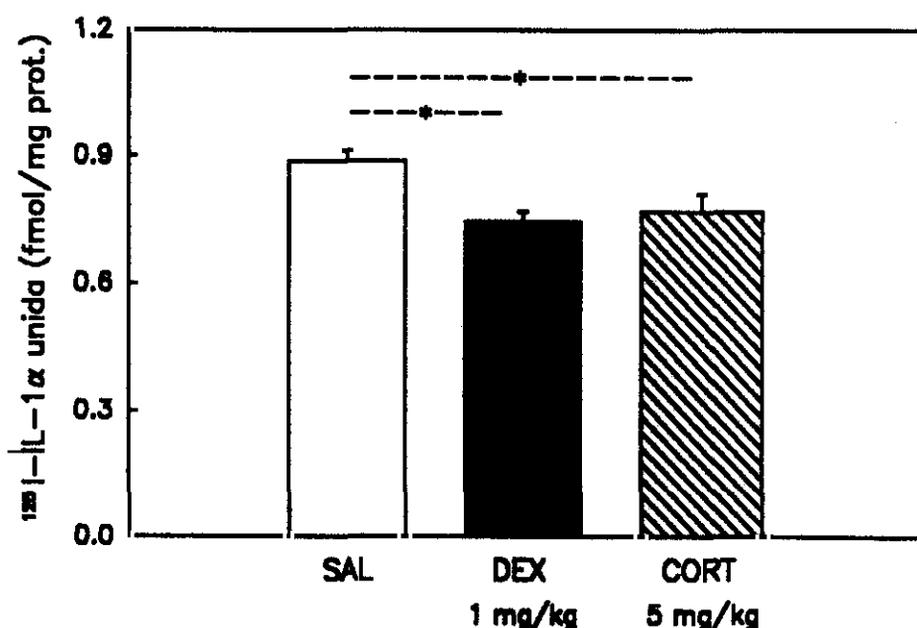


Fig. 4.9.: Unión al receptor de [¹²⁵I]rhIL-1 α en ratones BALB/c machos tras tratamiento con DEX (1 mg/kg) o CORT (5 mg/kg) en administración subcrónica. Los animales recibieron 5 dosis de corticosteroides separadas a intervalos de 12 horas (8 a.m. y 8 p.m.) y fueron sacrificados 2 horas después de la última dosis. DEX y CORT produjeron descensos significativos en la unión al receptor (DEX: 15.7%, CORT 13.4%). ANOVA: ($F_{2,22}=5.78$, $p<0.01$. Post-hoc Tukey B test: DEX<SAL $p<0.05$, DEX<CORT $p<0.05$).

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACION SUBCRONICA DE
CORTICOSTEROIDES SOBRE LA UNION AL IL-1R DE LA ${}^{125}\text{I}$ - $\text{IL-1}\alpha$

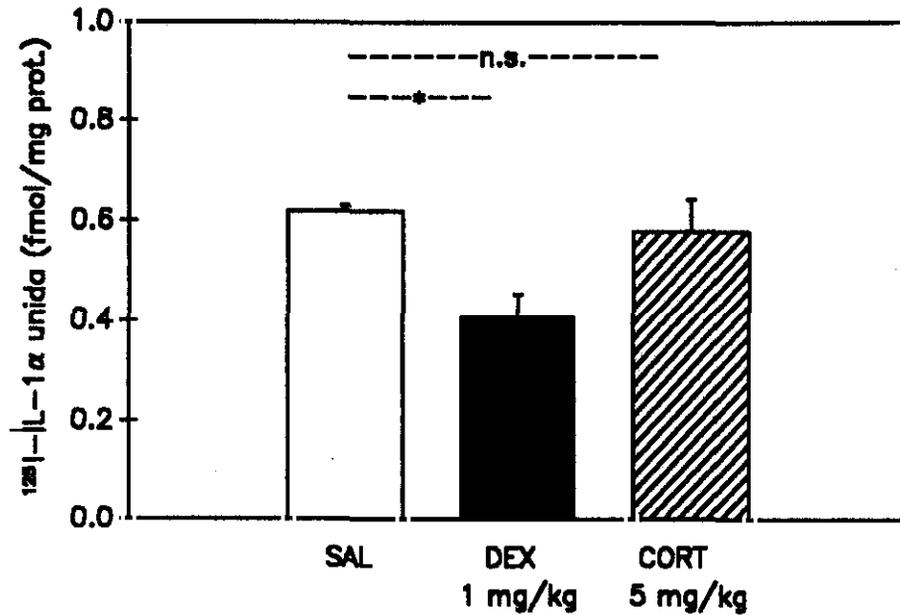


Fig 4.10.: Unión al receptor de ${}^{125}\text{I}$ IL-1 β en ratones BALB/c machos tras tratamiento con DEX (1 mg/kg) o CORT (5 mg/kg) en administración subcrónica. Los animales recibieron 5 dosis de corticosteroides separadas a intervalos de 12 horas (8 a.m. y 8 p.m.) y fueron sacrificados 2 horas después de la última dosis. El tratamiento con DEX produjo un descenso del 33.4% de la unión específica al receptor. CORT no produjo cambios significativos. ANOVA ($F_{2,8}=7.66$, $p<0.01$. Post-hoc Tukey B test DEX<SAL $p<0.05$).

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE CORTICOSTEOIDES
(*via s.c.*) SOBRE LA UNION AL IL-1R DE LA rhIL-1 α

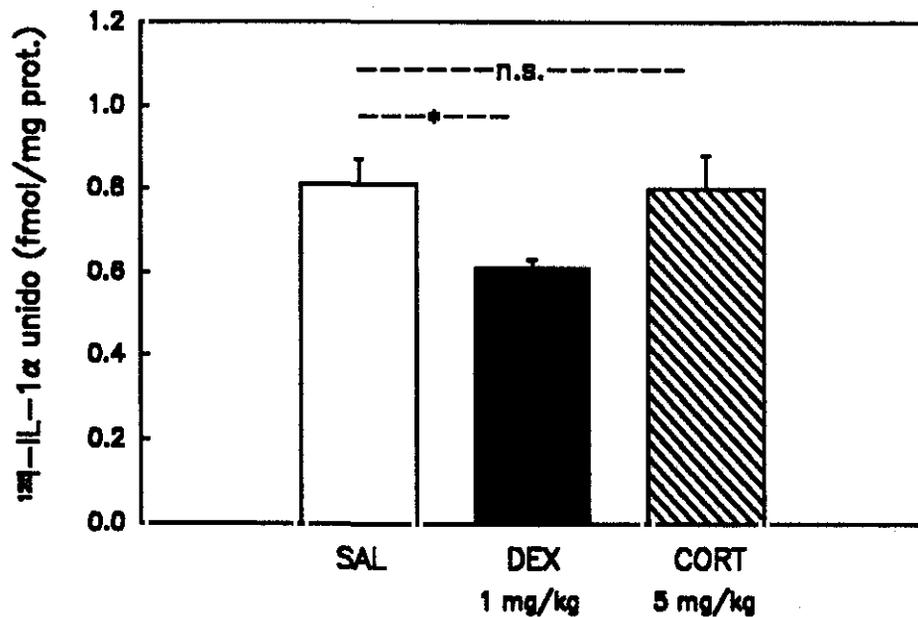


Fig 4.11.: Unión al receptor de IL-1 de la [¹²⁵I]rhIL-1 α en hipocampo de ratones BALB/c machos tras tratamiento con DEX (1 mg/kg) o CORT (5 mg/kg) o salino (SAL) en administración crónica. Los animales recibieron inyecciones a intervalos de 12 horas (8 a.m. y 8 p.m.) durante 8 días y fueron sacrificados 2 horas después de la última dosis. DEX produjo un descenso del 24.3% de la unión específica del receptor. ANOVA: ($F_{2,24} = 3.48, p < 0.05$. Post-hoc Tukey B test: DEX < SAL $p < 0.1$).

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE CORTICOSTERONA
(*pellet*) SOBRE LA UNION AL IL-1R DE LA rhIL-1 α

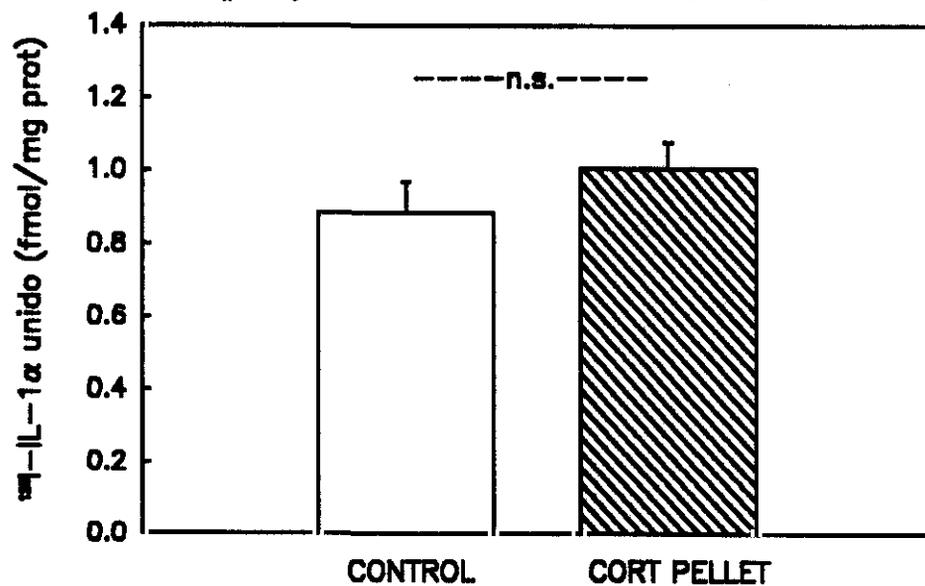


Fig 4.12.: Unión al receptor de IL-1 de la [¹²⁵I]rhIL-1 α en hipocampo de ratones BALB/c machos. Efecto de la administración de corticosterona a través de *pellets* de liberación continuada (70 μ g/h) durante 8 días. Los animales tratados con los *pellet* de CORT (1.00 \pm 0.07 fmol/mg de proteína) no muestran diferencias significativas respecto a los controles (0.89 \pm 0.22 fmol/mg proteína). T-test $p = 0.37$.

4.4.3. EFECTOS DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE CORTICOSTEROIDES SOBRE LA UNION AL RECEPTOR DE rhIL-1 α

Finalmente se analizó el efecto de la administración crónica de corticosteroides sobre la unión al receptor de [¹²⁵I]rhIL-1 α . La fig. 4.11. muestra el efecto sobre la unión al receptor de [¹²⁵I]rhIL-1 α en ratones BALB/c tras un tratamiento crónico con corticosteroides. Los animales recibieron inyecciones de DEX (1 mg/kg) o CORT (5 mg/kg) cada 12 horas durante 8 días. Los controles (SAL) recibieron inyecciones del vehículo únicamente. En los animales que recibieron inyecciones con DEX la unión específica al receptor de IL-1 disminuyó un 24.3% respecto a los animales tratados con SAL. Los animales tratados con CORT no se diferenciaron de los controles. El análisis de los distintos grupos por medio de un test de ANOVA indicó que existía una diferencia significativa entre los grupos, sin embargo el análisis post hoc mediante el test de Tukey B no detectó dicha diferencia (ANOVA $F_{2,24}=3.48$ $p<0.05$; Tukey B test: DEX<SAL $p<0.1$, DEX<CORT $p<0.1$).

Por último, se decidió usar un sistema de administración crónica de corticosteroides mediante la colocación de implantes subcutáneos de liberación continuada de corticosterona. Dichos implantes mantienen unos niveles constantes de corticosterona en plasma y con ellos se evitarían las fluctuaciones en los niveles de dicha hormona que se observan con la administración i.p. La fig. 4.12. muestra el SB de los animales que recibieron implantes de CORT en relación con los controles, no observándose diferencias entre los 2 grupos.

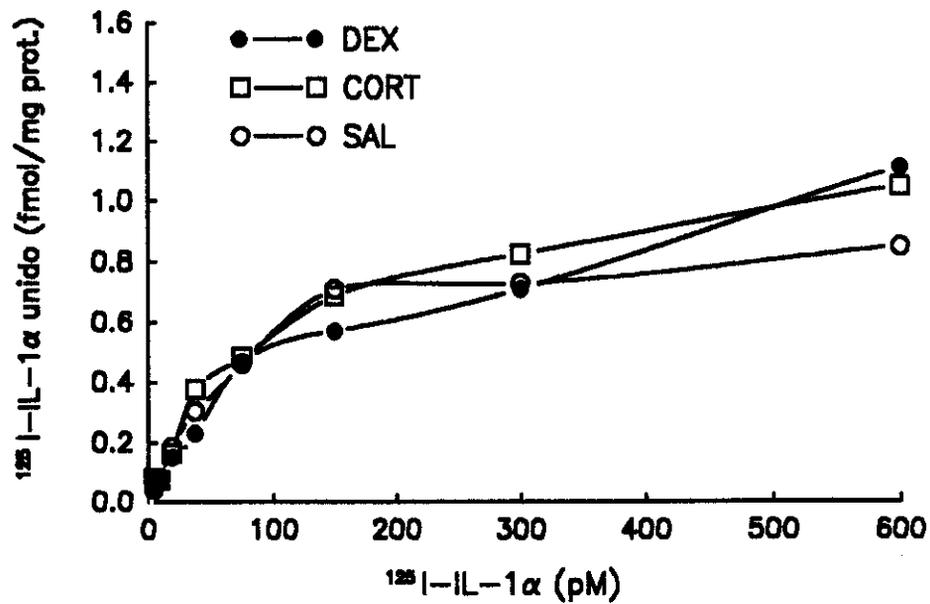
4.4.4. ESTUDIOS DE SATURACION PARA LOS EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA UNION AL RECEPTOR DE *rhIL-1 α*

Finalmente, para determinar si los cambios observados tras tratamientos corticosteroideos se deben a variaciones en el B_{max} o en el K_d , se realizaron estudios de saturación en animales tratados con DEX o CORT y en controles. La fig. 4.13. representa un *scatchard* significativo tras un tratamiento subcrónico (5 dosis i.p. administradas con 12 horas de diferencia). Se realizaron además de el *scatchard* señalado otros cuatro experimentos con resultados superponibles cuyas medias y S.E.M. están recogidos en la tabla 4.4.

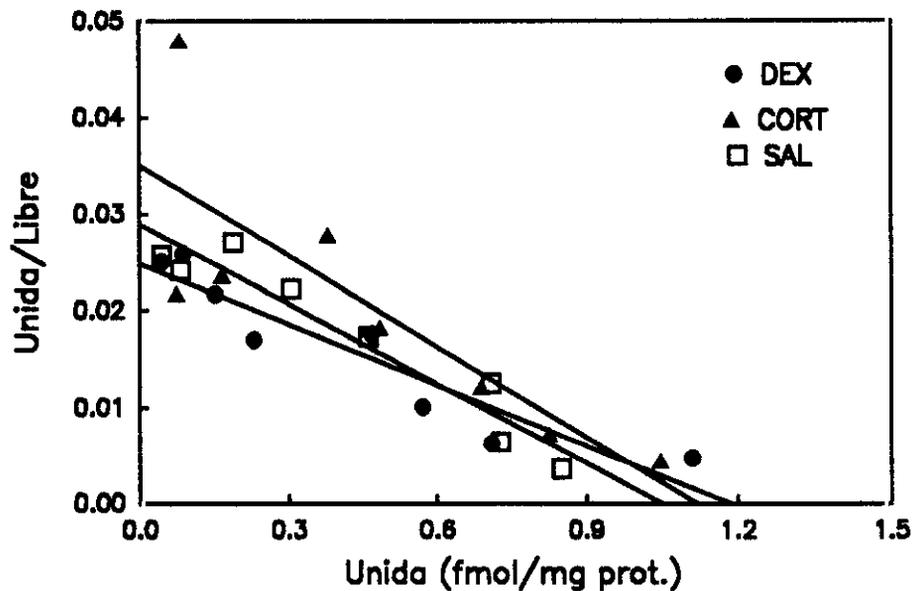
Igualmente se realizaron estudios de saturación para los tratamientos crónicos. Se inyectaron i.p. ratones BALB/c machos con DEX a dosis de 1 mg/kg cada 12 horas 8 días consecutivos. Los animales recibieron un total de 16 inyecciones y fueron sacrificados 2 horas después de la última inyección. Los hipocampos se procesaron según el protocolo habitual y el estudio de saturación no demostró diferencias significativas (Fig. 4.14.).

4.5. EFECTOS DE DISTINTOS MODELOS DE ESTRES SOBRE LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1

El siguiente paso consistió, una vez observados los efectos de la admistración exógena de glucocorticoides, estudiar si alteraciones en su secreción endógena tenían efectos similares. Para ello se usaron distintos modelos de estrés, que activasen distintas vías. Se usaron tres tipos de estrés distintos:



a).



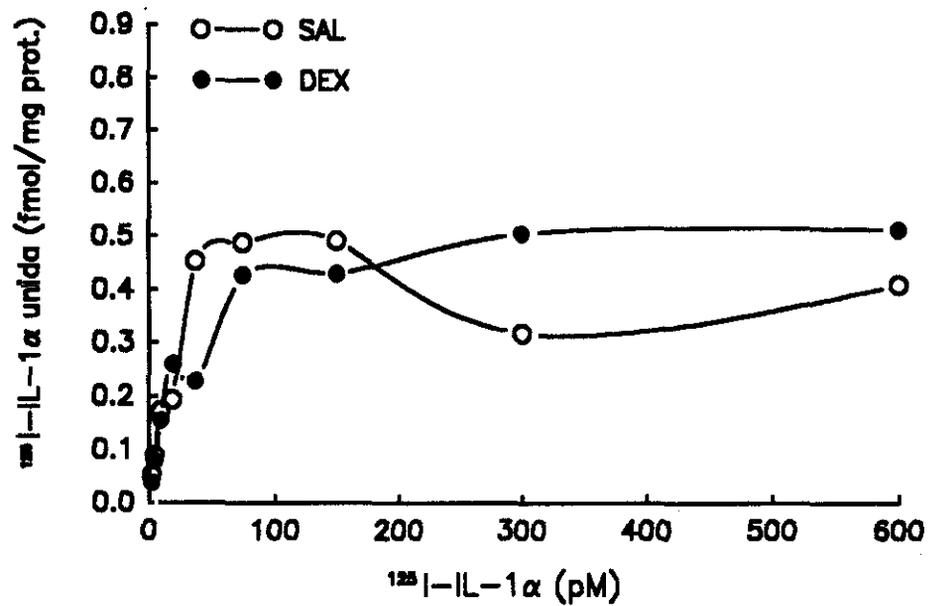
b).

Fig. 4.13.: Efecto de la administración subcrónica de glucocorticoides sobre la saturación y cinética del receptor de IL-1 en el hipocampo del ratón BALB/c macho. **a:** Curva de saturación de los niveles de unión específica al receptor de IL-1 a concentraciones crecientes de [¹²⁵I]rhIL-1α en animales tratados con DEX (1 mg/kg), CORT (5 mg/kg) o controles (SAL) en tratamiento subcrónico (5 dosis administradas a intervalos de 12 horas, sacrificándose los animales 2 horas después de la última dosis). **b:** Representación de un Scatchard significativo de los valores de unión específica al receptor de IL-1 en membranas de hipocampo tras tratamiento con DEX, CORT administrados en tratamiento subcrónico. Las membranas procedentes de hipocampos de 7-8 animales, que habían recibido tratamientos idénticos, se incubaron a concentraciones crecientes de ligando (2-600 pM). Los valores medios de B_{max} y de la K_d están recogidos en la tabla 4.4.

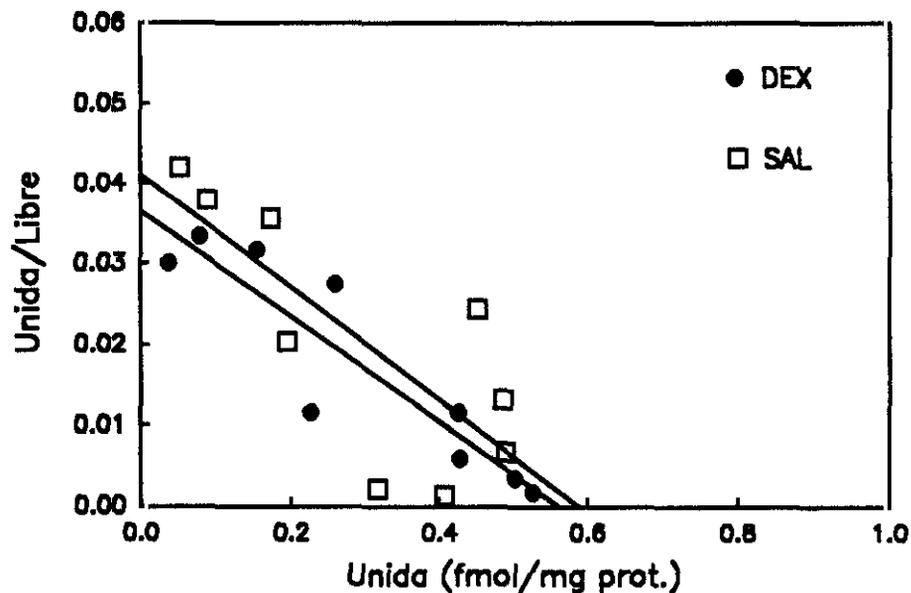
TABLA 4.4.: EFECTO DEL TRATAMIENTO SUBCRONICO CON GLUCOCORTICOIDES SOBRE EL NUMERO Y LA AFINIDAD DE LOS RECEPTORES DE IL-1 EN HIPOCAMPO DE RATON BALB/c MACHOS

Tratamiento	Kd (pM)*	Bmax* (fmol/mg proteina)
SAL	21.75 ± 3.69	1.09 ± 0.16
DEX	30.25 ± 4.70	1.03 ± 0.09
CORT	24.09 ± 3.63	1.13 ± 0.20

* Los valores representan la media±S.E.M. de cinco curvas de saturación obtenidas en experimentos distintos.



a).



b).

Fig 4.14.: Efecto de la administración crónica de DEX sobre la saturación y cinética del receptor de IL-1 en hipocampo de raton BALB/c macho. a: Curva de saturación de los niveles de unión específica al receptor de IL-1 a concentraciones crecientes de [¹²⁵I]rhIL-1α en animales tratados con DEX (1 mg/kg) en tratamiento crónico y controles (8 días en tratamiento con dosis administradas a intervalos de 12 horas, sacrificandose los animales 2 horas después de la última dosis). b: Representación de un Scatchard significativo de los valores de unión específica al receptor en membranas de hipocampo tras tratamiento con DEX administrada en tratamiento crónico. Membranas procedentes de hipocampos de 8 animales, que habían recibido tratamientos idénticos, se incubaron a concentraciones crecientes de ligando (2-600 pM). Los valores obtenidos para los animales tratados con SAL ($B_{max} = 0.59$ fmol/mg proteína y $K_d = 14.36$ pM) o DEX ($B_{max} = 0.56$ y $K_d = 15.42$) no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

4.5.1. *CHOQUE ELECTRICO INESCAPABLE*

Se utilizó una caja de evitación activa adaptada para ratones con una rejilla metálica conectada a un fuente de corriente continua. Los animales recibían una descarga eléctrica a través de la rejilla que no podían evitar. Las descargas se administraron 1 vez cada 12 segundos durante 15 min. Este protocolo se repitió 1 vez al día durante 5 días. Los animales fueron sacrificados 1 hora después de la última sesión.

4.5.2. *ESTRES ACUSTICO*

Se utilizó una cámara de insonorización que contenía dos altavoces a cada lado. Los animales recibieron descargas acústicas que se administraron durante 15 min divididas en 60 trenes intermitentes. Se realizó una sesión diaria durante 5 días y los animales fueron sacrificados 1 hora después de la última sesión.

4.5.3. *ESTRES TERMICO*

Los ratones fueron introducidos en una cámara refrigerada a 4°C durante 1 hora. Los animales fueron expuestos al frío 1 vez al día durante 5 días consecutivos y sacrificados 1 hora después de la última sesión.

Como controles se utilizaron animales del mismo peso y edad que habían permanecido durante todo el experimento en el animalario sin ser molestados.

En la fig. 4.15. se recogen los valores de SB para los distintos grupos. No se observan diferencias significativas entre los animales que recibieron las sesiones de estrés y los animales control.

EFFECTO DE DISTINTOS MODELOS DE ESTRES SOBRE
LA UNION AL IL-1R DE LA rhIL-1 α EN RATONES BALB/c

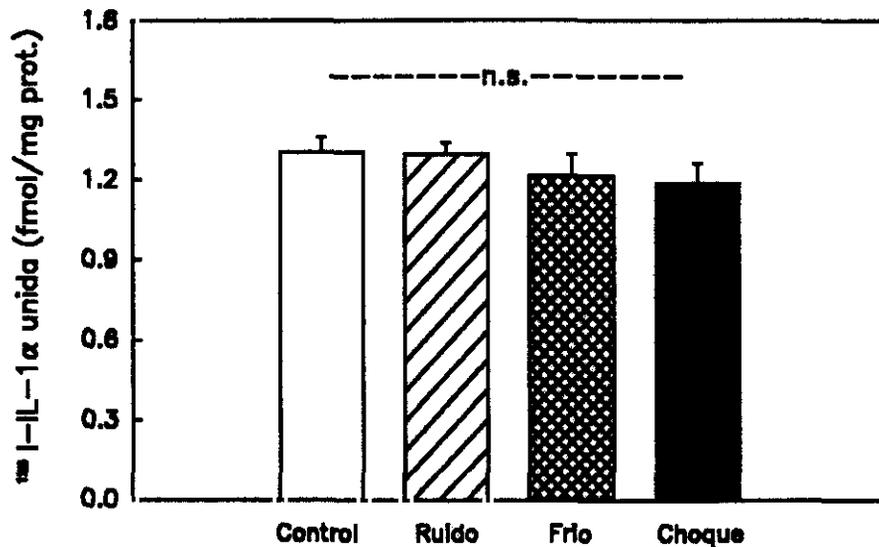


Fig 4.15.: Efecto de distintos tipos de estrés sobre la unión al receptor de IL-1 de la [¹²⁵I]rhIL-1 α en ratones BALB/c machos. Los animales recibieron un choque eléctrico inescapable de forma intermitente (Choque: 0.5 mA, administrado 1 vez cada 12 seg, durante 15 min), descargas acústicas intermitentes (Ruido: 110 db y 500 Hz, administrados durante 15 min en 60 trenes intermitentes con 10 seg *on* y 5 seg *off*) o estrés térmico (Frío: introducción en cámara a 4°C en jaulas individuales durante 1 hora). Todas las sesiones se realizaron 1 vez al día durante 5 días consecutivos. Los animales control se mantuvieron en el mismo animalario sin ser molestados. El análisis estadístico de los datos no mostró diferencias significativas entre los grupos (ANOVA $F_{3,28}=0.78$, $p=0.52$).

EFFECTO DE LA MANIPULACION NEONATAL (HANDLING)
SOBRE LA UNION AL IL-1R DE LA rhIL-1 α

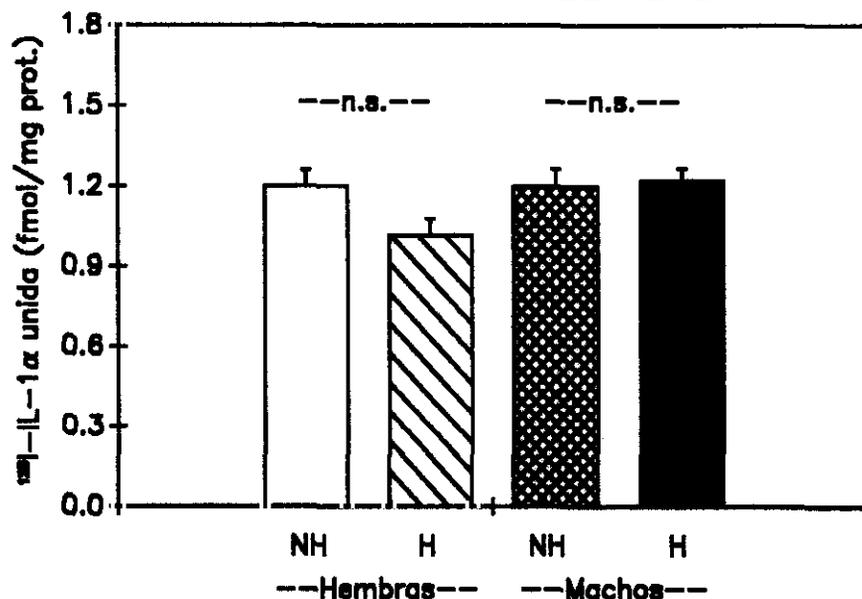


Fig 4.16.: Efecto del *handling* sobre la unión al receptor de IL-1 de [¹²⁵I]rhIL-1 α en ratones BALB/c machos y hembras. Los animales fueron separados de su madre y entorno durante 15 min, 1 vez al día, 21 días consecutivos (H). Como control (NH) sirvieron animales nacidos el mismo día y mantenidos en el mismo animalario sin ser molestados. El día 22 post-natal fueron separados en 4 grupos según sexo y tratamiento. Todos los animales fueron sacrificados a las 13 semanas de edad y los hipocampos procesados según el protocolo habitual. No se observaron diferencias significativas entre los animales H y NH (T-test: $p=0.23$).

4.5.5. EFECTO DE LA MANIPULACION NEONATAL (HANDLING) SOBRE EL LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1

La manipulación neonatal (*handling*) consiste en una técnica de estrés durante el periodo neonatal, que ha demostrado aumentar el número de receptores para glucocorticoides (GC-R) tipo II en el hipocampo en los animales adultos, modificando toda la respuesta del eje H-H-A. Por ese motivo tratamos de estudiar si a través de esta técnica podía alterarse la modulación que dichos glucocorticoides ejercen sobre la unión al receptor de IL-1 de la rhIL-1 α . Para ello se sometió a un grupo de ratones BALB/c recién nacidos a un entorno extraño y a la privación de la presencia materna durante 15 minutos diarios y 21 días consecutivos. Como control se utilizaron animales de la misma camada, que permanecieron con la madre durante todo el experimento. Los animales pasados estos 21 días se dividieron según sexo y grupo de tratamiento y se mantuvieron en las condiciones habituales del animalario.

Los animales fueron sacrificados hacia la semana trece de vida y los hipocampos procesados de la forma habitual. En la fig. 4.16 se recogen los resultados del estudio, donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos manipulados neonatalmente y los no manipulados.

4.6. MODULACION DEL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOCAMPO ATRAVES DE LA ADMINISTRACION PERIFERICA DE LIPOPOLISACARIDO

Estudiamos las variaciones que se producen en la unión al receptor de IL-1 en hipocampo de ratón BALB/c tras la administración de lipopolisacárido (LPS) intraperitoneal. Los animales fueron inyectados con 0.3 ml de una dilución en

MODULACION DEL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOCAMPO
POR LA ADMINISTRACION PERIFERICA DE LPS

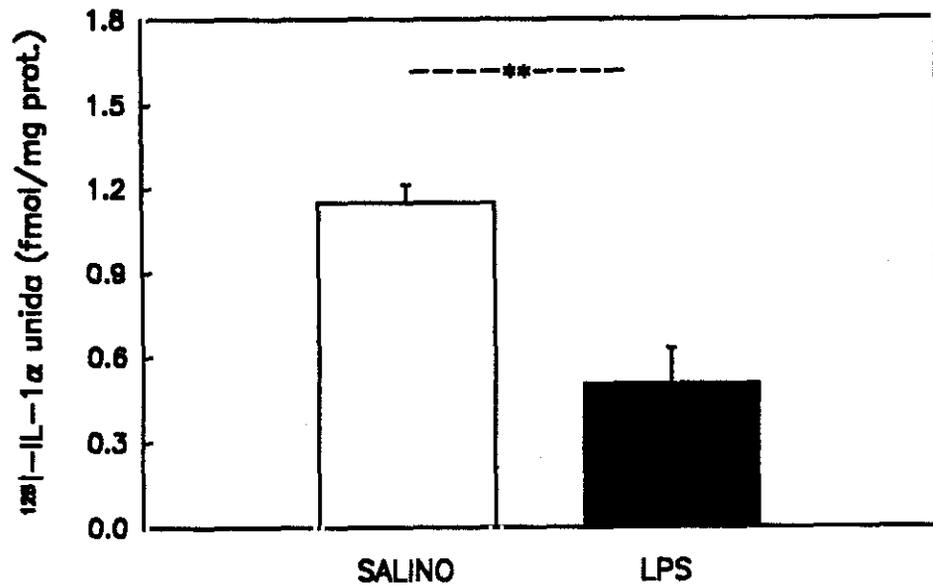
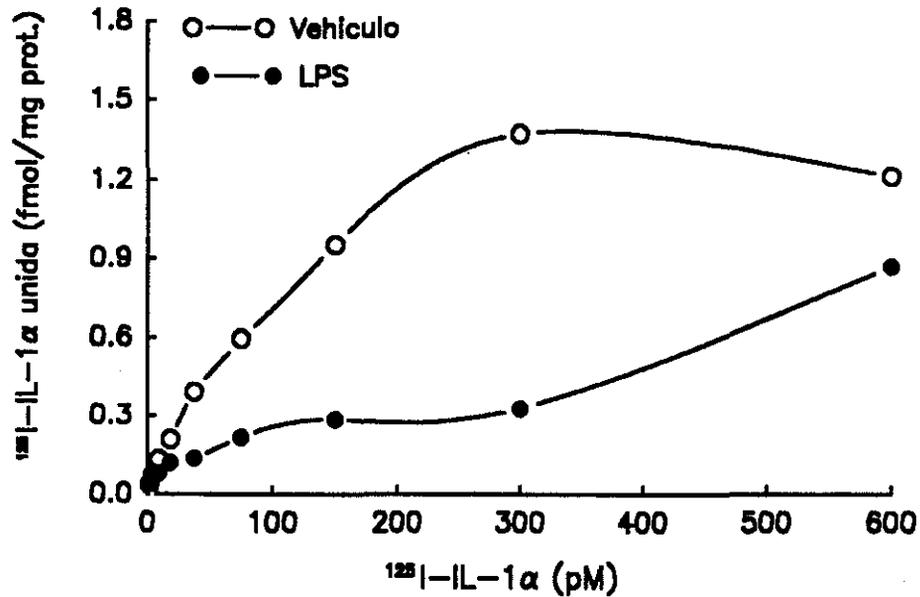
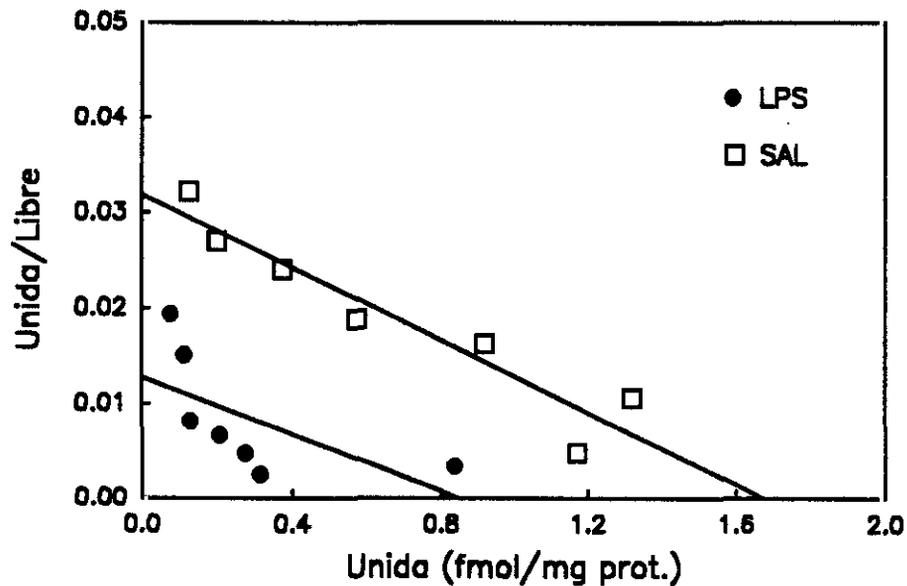


Fig 4.17.: Efecto de la administración periférica de lipopolisacárido (LPS) sobre la unión específica al receptor de IL-1 en hipocampo de ratón BALB/c macho. Los animales fueron inyectados 2 veces con 30 μ g de LPS i.p. a un intervalo de 12 horas. Como control se usaron animales inyectados con el vehículo en una pauta idéntica. Todos los animales fueron sacrificados 2 horas después de la última dosis. La unión específica al receptor de IL-1 de la [¹²⁵I]rhIL-1 α fue significativamente menor en los animales tratados con LPS (SB: 37.84 \pm 4.94 [media \pm S.E.M.]), que en los controles (SB: 56.47 \pm 1.62). T test: p = 0.0026.



a).



b).

Fig 4.18.: Efecto del tratamiento con lipopolisacárido (LPS) sobre la unión al receptor de IL-1 de ^{125}I]rhIL-1 α en hipocampo de ratones BALB/c machos. a: curva de saturación de los niveles de unión específica al receptor de IL-1 a concentraciones crecientes de ^{125}I]rhIL-1 α en animales tratados con LPS (30 μg /animal en 2 dosis con 12 horas de intervalo) y controles. Las diferencias entre ambos grupos fueron significativas (ANOVA: $F_{2,42} = 17.39$, $p < 0.0001$. Post-hoc Tukey B Test: $\text{LPS} < \text{SAL}$ $P < 0.01$). b: Scatchard de los valores de unión específica al receptor en membranas de hipocampo tras tratamiento con LPS. Las membranas de hipocampus de 7 animales se incubaron a concentraciones crecientes de ligando (2-600 pM). La gráfica muestra que el descenso de la unión específica al receptor de IL-1 se debe a un descenso en el B_{max} (SAL: 1.75 fmol/mg proteína, LPS: 0.41 fmol/mg proteína) manteniéndose los valores de la K_d dentro de un rango similar (SAL: 52.5 pM, LPS: 19.97 pM).

suero salino estéril de 0.1 mg/ml de LPS procedente de E.Coli serotipo 026:B6, con lo que se administró 30 μ g/animal de LPS. Los animales recibieron dos dosis de LPS i.p. (8 a.m. y 8 p.m.) y fueron sacrificados dos horas después de la última dosis. Los animales control recibieron una inyección i.p. de vehículo de igual volumen y en la misma pauta. Los hipocampos fueron extraídos rápidamente y procesados según el protocolo habitual.

La fig. 4.17. muestra el SB para [125 I]rhIL-1 α en los animales control y en los que recibieron LPS. Como se ve en la figura la unión de [125 I]rhIL-1 α al receptor de IL-1 en los animales tratados con LPS está significativamente reducido en relación con los controles (LPS: SB = 37.84 \pm 4.94 [media \pm S.E.M.]; SAL: SB = 56.47 \pm 1.62; T test: p<0.001).

Seguidamente se realizaron estudios de saturación que demostraron que la administración periférica de LPS producía un descenso significativo de los valores del SB a varias concentraciones de ligando (ANOVA: $F_{2,42} = 17.39$, p<0.0001; Tukey B Test: SAL>LPS, p<0.01). Dicho descenso se producía a costa de una disminución significativa en el B_{max} (control: 1.75 fmol/mg proteína; LPS: 0.41 fmol/mg de proteína), sin que hubiese cambios significativos en la K_d de la reacción (control: 52.5 pM; LPS: 19.97 pM). La fig. 4.18. muestra estos cambios.

4.7. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DEXAMETASONA SOBRE LA MODULACION INDUCIDA POR LPS SOBRE LA UNION DE rhIL-1 α AL RECEPTOR DE IL-1 EN RATONES BALB/c

El tratamiento con LPS produce un descenso muy significativo en la unión de [125 I]rhIL-1 α a su receptor. Estudiamos seguidamente el efecto que sobre

TABLA 4.5.: PAUTA DE ADMINISTRACION DE LIPOPOLISACARIDO (LPS) Y DEXAMETASONA (DEX) EN RATONES BALB/C PARA EL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DEX SOBRE LA MODULACION PRODUCIDA POR LPS SOBRE LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1.

	Día 0	Día 1	Día 2
8.00 a.m.		DEX	DEX
10.00 a.m.		LPS	sacrificio
8.00 p.m.	DEX	DEX	
10.00 p.m.		LPS	

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE DEXAMETASONA SOBRE
LA MODULACION DEL BINDING DE rhIL-1 α POR LPS (i.p.)

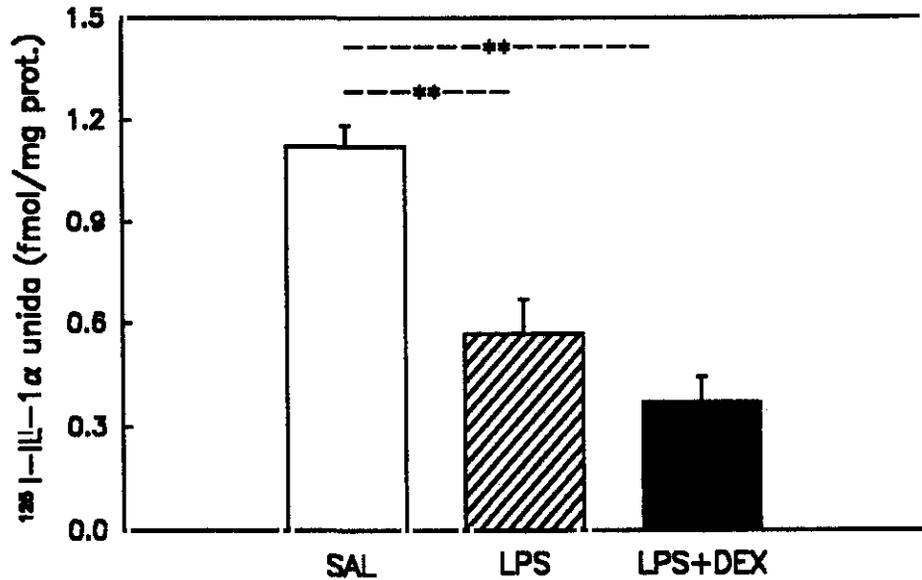


Fig 4.19.: Efecto del tratamiento con DEX y LPS sobre la unión específica al receptor de IL-1 con [^{125}I]rhIL-1 α . Los animales fueron inyectados i.p. con LPS (30 $\mu\text{g}/\text{animal}$) o SAL, 24 y 12 horas antes de ser sacrificados. Además recibieron DEX (1 mg/kg) o SAL i.p., 14 horas antes de la primera inyección de LPS, 2 horas antes de cada inyección de LPS y 2 horas antes del sacrificio (ver tabla 4.5.). Se midieron los niveles de unión específica al receptor usando una concentración de [^{125}I]rhIL-1 α de 150 pM/tubo (50 pM concentración final). La administración de LPS redujo significativamente los niveles de unión específica al receptor de IL-1 del ligando, pero los niveles de dicho descenso no se diferenciaron de los observados con la administración concomitante de LPS + DEX (ANOVA $p < 0.0001$. Post-hoc Tukey B test: LPS < SAL $p < 0.01$, LPS+DEX < SAL $p < 0.01$). No hubo diferencias significativas entre los animales tratados con DEX y los DEX + LPS.

dicha modulación podía ejercer la administración de glucocorticoides. Se usaron ratones BALB/c machos que recibieron una inyección i.p. de LPS (0.3 ml de una solución de 0.1mg/ml). La mitad de los animales fueron tratados con dexametasona (1mg/kg) por vía i.p. La tabla 4.5. recoge la pauta de administración.

La administración de DEX previa a la inyección de LPS produjo un descenso significativo de la unión al receptor de rhIL-1 α respecto a los animales tratados únicamente con SAL (Tukey B: SAL>LPS+DEX $p<0.01$). Sin embargo, la comparación de los grupos LPS y LPS+DEX no reveló diferencias significativas.

Hay, sin embargo, que señalar que los signos clínicos de choque endotóxico que presentan estos animales tras la inyección con LPS (diarrea, secreción conjuntival, malestado general, piloerección) fueron mucho menos llamativos en los animales tratados con LPS+DEX, que en el grupo de los tratados únicamente con LPS.

4.8. EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA (ADX) SOBRE LA UNIÓN AL RECEPTOR DE rhIL-1 α

Hasta ahora hemos estudiado los efectos de un incremento de los niveles de glucocorticoides sobre unión al receptor de IL-1 de rhIL-1 α en el hipocampo. En los siguientes experimentos se estudió la deprivación de dichas hormonas sobre unión al receptor de rhIL-1 α en el hipocampo de ratones BALB/c.

Los ratones fueron adrenalectomizados usándose como control animales sometidos a un procedimiento quirúrgico similar, pero en los que no se les extirpó

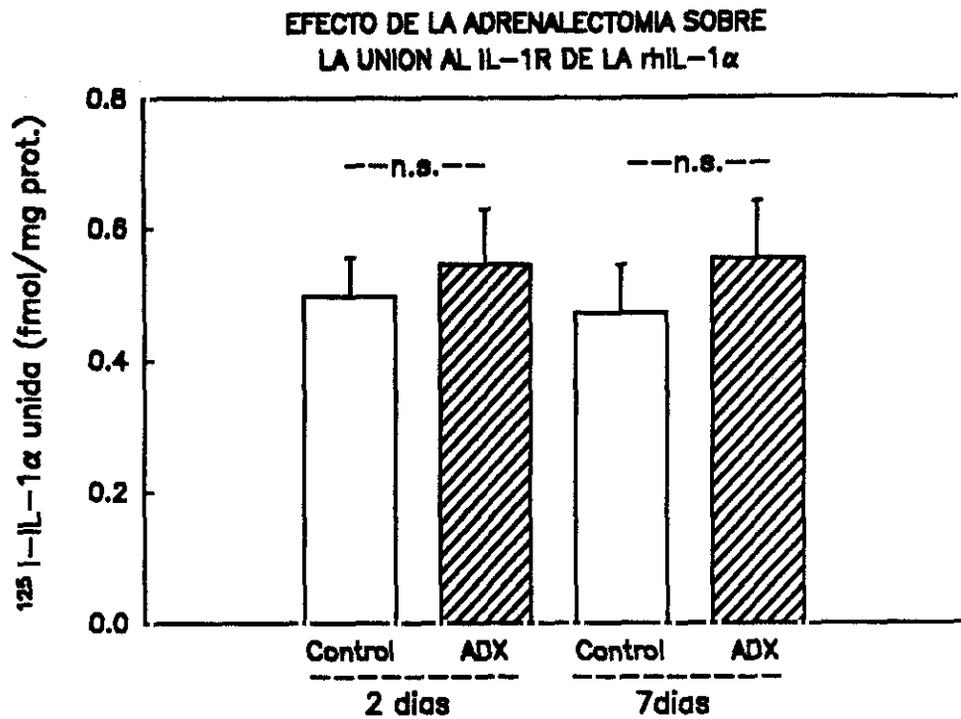


Fig 4.20.: Efecto de la adrenalectomía sobre la unión específica al receptor de IL-1 de la [¹²⁵I]rhIL-1 α en ratones BALB/c machos. Los animales fueron sacrificados 2 días después de la intervención (n=10, 5 sham y 5 ADX) o 7 días después de la intervención (n=10, 5 sham y 5 ADX). Se midieron los niveles de unión específica al receptor usando una única concentración de [¹²⁵I]rhIL-1 α de 50 pM concentración final. El análisis de los animales ADX no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles (T-test _{2 días}: p=0.83; T-test _{7 días}: p=0.93).

la glándula suprarrenal. Un grupo de animales fue sacrificado en el día 2 post-ADX y otro grupo en el día 7 post-ADX.

La fig. 4.20. recoge los datos de la unión de $rhIL-1\alpha$ al receptor de IL-1 en hipocampo para animales ADX y controles. No se observaron diferencias entre los controles y los animales ADX.

4.9. EFECTO "IN VITRO" DE LOS CORTICOSTEROIDES EXOGENOS SOBRE LA UNION DE $rhIL-1\alpha$ AL RECEPTOR DE IL-1

Estudiamos los efectos "in vitro" de los corticosteroides utilizando dos series de experimentos. En un primer grupo se incubaron homogenizados de membranas con DEX o CORT a temperatura ambiente durante 3 horas. Si bien es conocido que los receptores para glucocorticoides descritos clásicamente son receptores citosólicos, en la actualidad se conocen también efectos de dichas hormonas sobre puntos de unión en membrana, caracterizados como receptores propiamente dichos en anfibios y de los que se tiene evidencia electrofisiológica en mamíferos. En un segundo grupo de experimentos los hipocampos fueron troceados en láminas de $400\ \mu\text{m}$ e incubados en medio Krebs-Ringer durante 90 min en presencia de distintas concentraciones de corticosteroides. A diferencia de los experimentos realizados con membranas en este grupo la integridad tisular permitiría un efecto de activación genómica aunque en tiempos cortos de incubación.

4.9.1. EFECTOS DE LOS CORTICOSTEROIDES "IN VITRO" SOBRE LA UNIÓN AL RECEPTOR DE rhIL-1 α EN HOMOGENIZADOS DE MEMBRANA DE HIPOCAMPO DE RATONES BALB/c MACHOS

En el primer grupo de experimentos se estudió el efecto de la administración de concentraciones equimolares de DEX y CORT sobre una suspensión de membranas de hipocampo de ratón BALB/c macho. Las membranas se procesaron según el protocolo habitual (Material y Métodos apartado 3.2.1.1.). Una vez homogenizados los hipocampos de 26 animales se dividieron en 4 grupos con una concentración de proteínas ajustada a 133 $\mu\text{g/ml}$, idéntica en los distintos grupos. Seguidamente se añadió DEX (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M), o CORT (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M) a uno de los grupos, añadiéndose a uno de los grupos únicamente vehículo. Las muestras se incubaron 3 horas a temperatura ambiente. La figura 4.21. muestra el efecto de la DEX sobre la unión al receptor de IL-1 a las concentraciones descritas. Aunque parecía que a una concentración de DEX a 10^{-6} M disminuía la unión al receptor, esta disminución no alcanzó significación estadística (T-test: $p=0.38$). La administración de CORT a distintas dosis (Fig. 4.22.) no produjo efecto alguno sobre la unión al receptor de IL-1 en relación con el control.

En vista de la tendencia observada con la administración de DEX 10^{-6} M, se realizó un nuevo experimento para valorar si el efecto observado a estas dosis se incrementaba al aumentar la dosis de DEX aunque fuese en rangos farmacológicos. La fig. 4.23. muestra el efecto de la administración de DEX 10^{-4} M sobre la unión de la IL-1 a su receptor no observándose diferencias significativas respecto al grupo control. Con estos datos podemos concluir que la administración de DEX o CORT sobre un homogenizado de membranas no modifica la unión de la rhIL-1 α al receptor de IL-1.

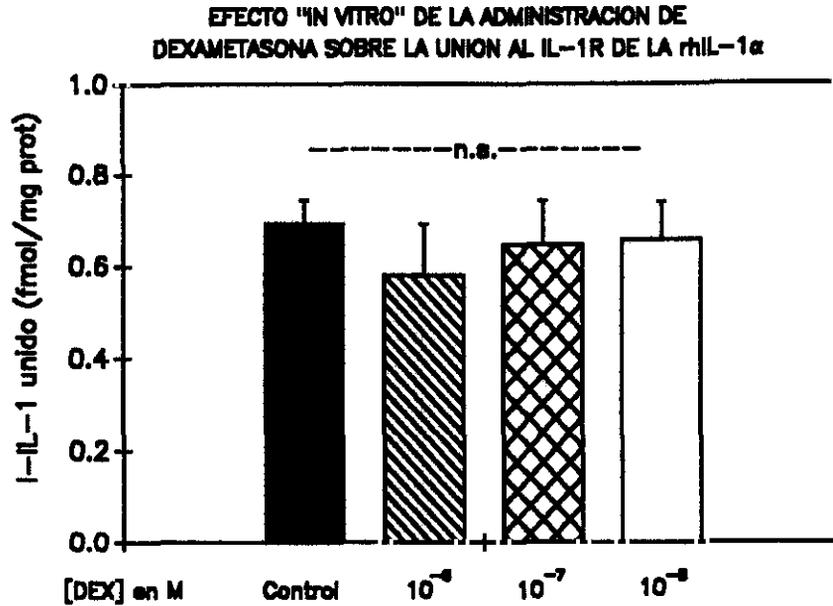


Fig 4.21.: Efecto de la DEX "in vitro" sobre la unión al receptor de IL-1 en una suspensión de homogenizados de membranas de hipocampo de ratón BALB/c macho. Se mezclaron los hipocampos de 6 animales por cada grupo, separándose las membranas mediante centrifugación. Estas membranas se incubaron en presencia de distintas concentraciones de DEX durante 3 horas a T.A. (ANOVA: $F_{3,12} = 0.35$, $p=0.79$)

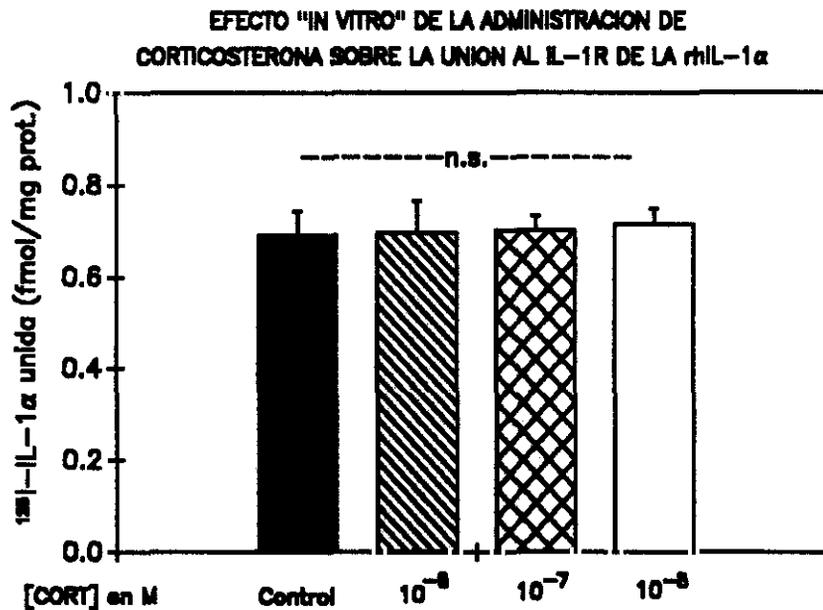


Fig 4.22.: Efecto de la CORT "in vitro" sobre la unión al receptor de IL-1 en una suspensión de homogenizados de membranas de hipocampo de ratón BALB/c macho. Se mezclaron los hipocampos de 6 animales por cada grupo, separándose las membranas mediante centrifugación. Estas membranas se incubaron en presencia de distintas concentraciones de CORT durante 3 horas a T.A. (ANOVA: $F_{3,12} = 0.042$, $p=0.98$)

EFFECTO "IN VITRO" DE LA ADMINISTRACION DE
DEXAMETASONA (10^{-4}) LA UNION AL IL-1R DE LA rhIL-1 α

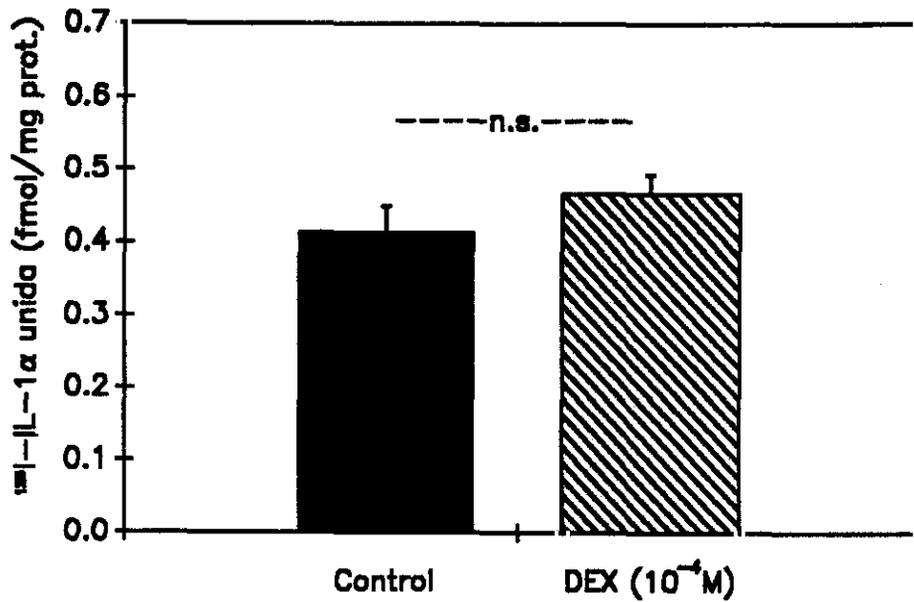


Fig. 4.23.: Efecto de la administración de DEX 10^{-4} M sobre la unión al receptor de IL-1 en membranas de hipocampo de ratón BALB/c macho. Se mezclaron las membranas de 5 animales por grupo incubándose en presencia de DEX 10^{-4} M durante 3 horas a T.A. La DEX no produjo una modificación significativa de la unión al receptor en relación con los controles (T-Test: $p=0.47$)

En conclusión, la incubación "in vitro" de homogenizados de membranas de hipocampo de ratón BALB/c machos, produjo niveles de unión al receptor similares a los observados en los ensayos "in vivo". La incubación de homogenizados de membrana de hipocampo en presencia de dosis crecientes, tanto de DEX como de CORT, no produjo niveles de unión al receptor de IL-1 diferentes a los de los controles. Es decir, los corticosteroides no modularon en ningún momento dicha unión al receptor de IL-1.

4.9.2. EFECTOS DE LOS CORTICOSTEROIDES "IN VITRO" SOBRE LA UNIÓN AL RECEPTOR DE IL-1 EN RODAJAS DE HIPOCAMPO DE RATONES BALB/c MACHOS

En un segundo grupo de experimentos "in vitro" se usaron rodajas de hipocampo, en vez de membranas, que mantendrían toda la estructura de sostén y la integridad celular. Los hipocampos, una vez extraídos, se cortaron en láminas de 400 μm de grosor y se incubaron en medio Krebs-Ringer gaseado con 95% de O_2 y 5% de CO_2 a saturación, durante 90 min a 37°C en un baño con agitación suave. Una vez finalizada la incubación las rodajas de hipocampo se lavaron y posteriormente homogenizaron siguiendo el protocolo habitual (Material y Métodos, apdo.3.2.1.1.), ajustándose la concentración de proteínas de 200 a 266 $\mu\text{g/ml}$. Con este método se obtuvieron porcentajes de unión específica de 35.54 ± 1.72 (mean \pm S.E.M.) y el aumento de la concentración de proteínas, aunque aumentó el número de cpm del SB, no modificó significativamente el valor de SB (37.3 ± 3.59). En cualquier caso, dicho valor fue siempre inferior a los porcentajes de SB obtenidos en los experimentos "in vivo", y que en los estudios "in vitro" con homogenizados de membranas.

En un primer grupo de experimentos estudiamos el efecto de la administración de DEX a concentraciones de 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} M sobre la unión al receptor de IL-1 en rodajas de hipocampo. Como en los experimentos con CORT, la DEX a concentraciones 10^{-6} y 10^{-8} M no produjo cambios significativos en la unión al receptor de IL-1. A una concentración de 10^{-4} M, sin embargo, sí existió un descenso significativo aunque de escasa magnitud respecto al control (T-test; $p=0.03$). La fig. 4.24. refleja estos resultados.

En subsiguientes experimentos se preincubaron rodajas de hipocampo de raton BALB/c con concentraciones de 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} M de CORT. La fig. 4.25. muestra los resultados obtenidos en relación con el grupo control. No se observaron diferencias significativas en los grupos tratados respecto al grupo control, aunque CORT a una concentración de 10^{-4} M parecía disminuir la unión al receptor de IL-1 en relación al control (T-test, $p=0.21$).

En conclusión, en los experimentos "in vitro" con rodajas de hipocampo, se obtuvo unión al receptor de IL-1 con el ligando [125 I]rhIL-1 α , si bien el porcentaje de unión específica fue de aproximadamente un 25-33% menor, que en los experimentos "in vivo" o los realizados "in vitro" con homogenizados de membranas. Los corticosteroides DEX y CORT no modularon significativamente dicha unión al receptor. A concentraciones muy elevadas (10^{-4} M) se observó una disminución muy discreta, que difícilmente representará una situación fisiológica.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE DEX "IN VITRO" SOBRE LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1, EN RODAJAS DE HIPOCAMPO DE RATONES BALB/c MACHOS

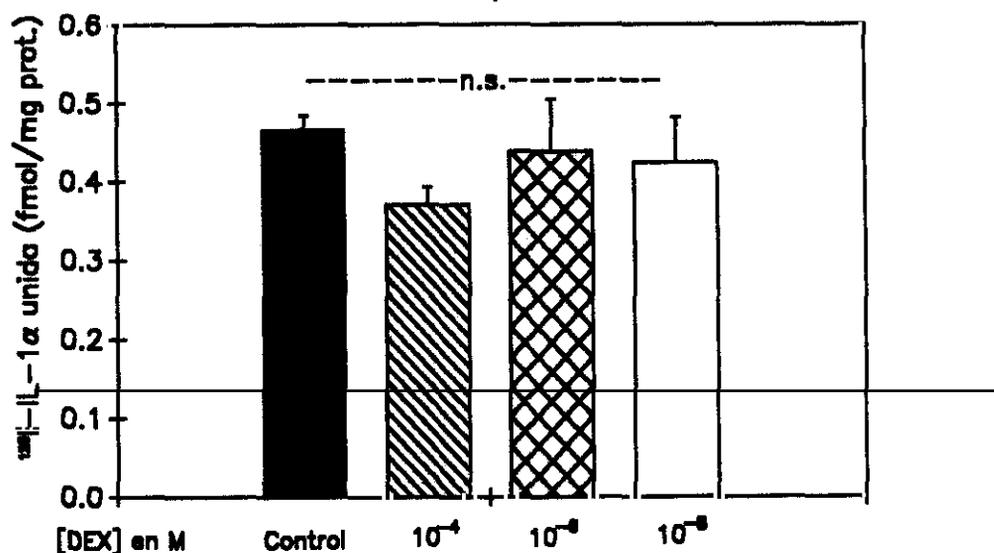


Fig. 4.24.: Efecto de la dexametasona "in vitro" sobre la unión al receptor de IL-1 en rodajas de hipocampo de ratones BALB/c machos. Los hipocampos fueron troceados en rodajas de 400 μm e incubadas durante 90 minutos a 37°C en medio Krebs-Ringer, en presencia de diferentes concentraciones de DEX. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos respecto al control (ANOVA: $F_{3,11} = 1.05$; $p=0.4$).

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE CORT "IN VITRO" SOBRE LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1, EN RODAJAS DE HIPOCAMPO DE RATONES BALB/c MACHOS

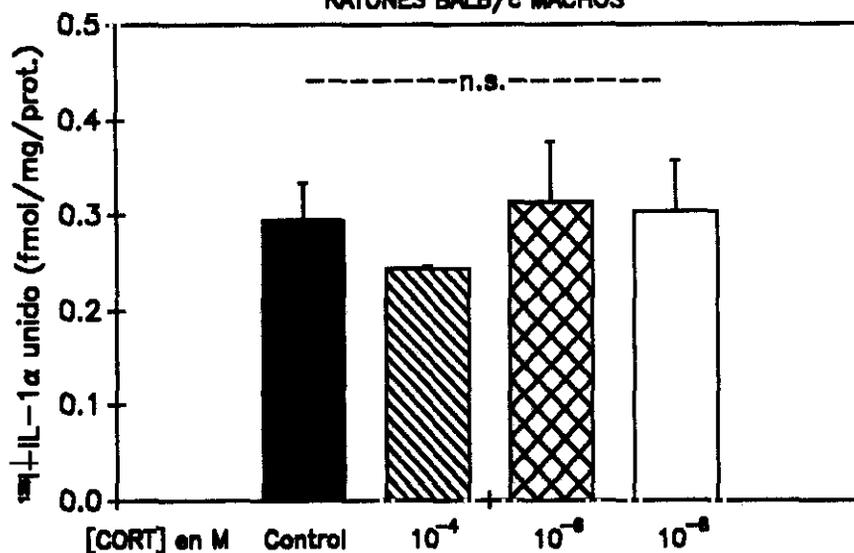


Fig. 4.25.: Efecto de la corticosterona "in vitro" sobre la unión al receptor de IL-1 en rodajas de hipocampo de ratones BALB/c machos. Los hipocampos fueron troceados en rodajas de 400 μm e incubadas durante 90 minutos a 37°C en medio Krebs-Ringer, en presencia de diferentes concentraciones de CORT. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos respecto al control (ANOVA: $F_{3,11} = 0.35$; $p=0.79$).

4.10. MODULACION DE LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOCAMPO, EN LA ENCEFALOMIELITIS POR VIRUS DE THEILER, UN MODELO ANIMAL DE ESCLEROSIS MULTIPLE.

En la última parte de este trabajo decidimos analizar la posible modulación del receptor central de IL-1 en un modelo de enfermedad en el que se indujese la síntesis y liberación de IL-1 en el SNC. La encefalomiелitis que produce la inyección intracerebral del virus de Theiler (TMEV), un picornavirus de la familia de los cardiovirus, en ratones de la cepa SJL/J es un modelo que se ha venido utilizando para estudiar la Esclerosis Múltiple humana. En cultivos de astrocitos procedentes de ratones SJL/J se ha observado, que la adición de TMEV produce un aumento de la secreción de IL-1 al medio de cultivo, que no ocurre si se añade el virus TMEV a astrocitos procedentes de una cepa resistente como los BALB/c.

El estudio de la unión al receptor de IL-1 en ratones SJL/J machos y hembras demostró que, al contrario de lo que sucedía en los ratones BALB/c, existían diferencias significativas entre los géneros. Se incubaron los hipocampos de ratones SJL/J machos (n=4) y hembras (n=7) con [¹²⁵I]rhIL-1α 150 pM durante 3 horas a T.A. Tras procesarse las membranas según el protocolo habitual se obtuvieron valores de SB de un 61.36%±1.20 (media±S.E.M.) para los machos y de 48.36%±1.82 para las hembras (T-test, p<0.001). La fig. 4.26 recoge estos datos. Por este motivo en los subsiguientes experimentos se usarían exclusivamente ratones machos.

Seguidamente estudiamos la capacidad de unión al receptor de IL-1 en animales inyectados con 5x10⁷ a 1x10⁸ pfu/ml de TMEV administradas en una inyección intracerebral (30μl), y se comparó con animales que recibieron una

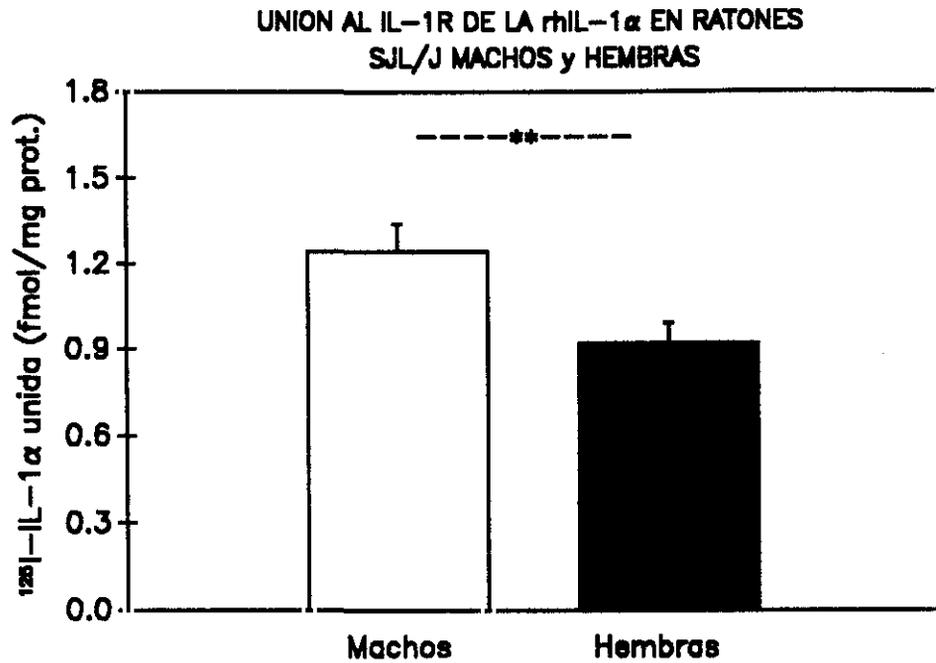


Fig. 4.26.: Unión al receptor de IL-1 en ratones SJL/J machos y hembras con [125I]rhIL-1 α (150 pM) como ligando. Los hipocampos de ratones SJL/J de 8 semanas de edad se procesaron según el protocolo habitual (machos, n=4; hembras n=7). Los SJL/J machos presentaron una unión al receptor significativamente mayor que las hembras (T-test, p<0.001).

EFFECTO DE LA INFECCION POR TMEV SOBRE LA UNION AL IL-1R
EN RATONES SJL/J, EN FUNCION DEL TIEMPO TRANSCURRIDO
TRAS LA INFECCION

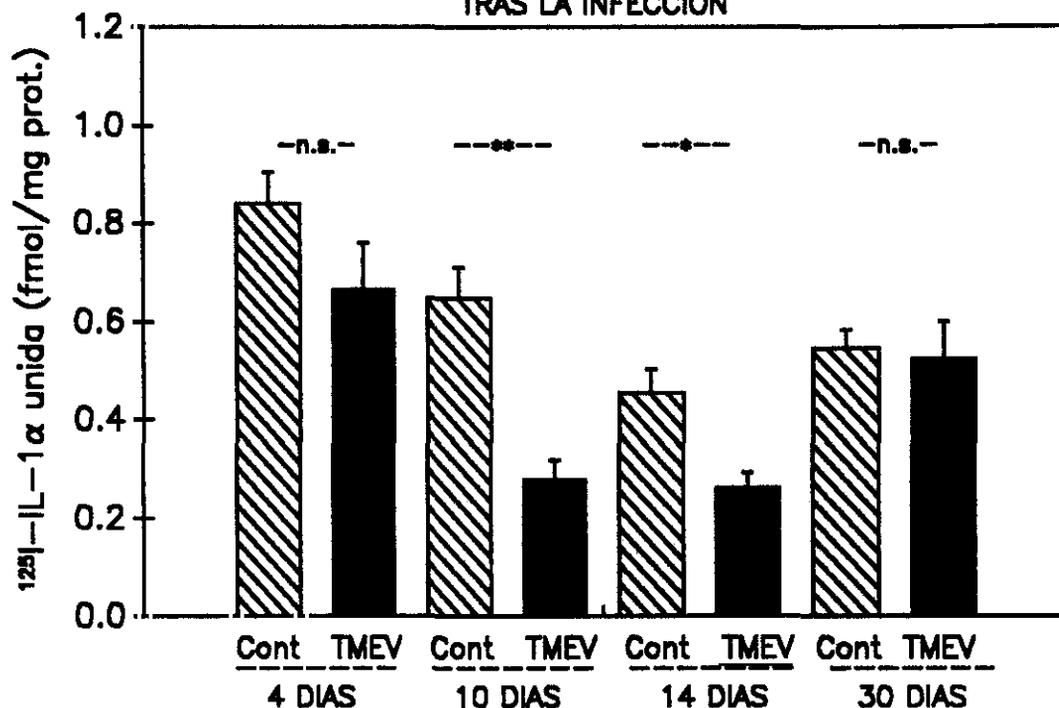


Fig. 4.27.: Efecto sobre la unión al receptor de IL-1 de la [¹²⁵I]rhIL-1α inducido por el TMEV en función del tiempo transcurrido tras la infección. Ratones SJL/J machos de 3-4 semanas de edad recibieron una inyección i.c. de 1x10⁸ pfu/ml de TMEV en una suspensión de DMEM con 10% FCS. Como control se usaron ratones de la misma cepa y edad inyectados con el mismo volumen (30μl) del vehículo únicamente. Los animales fueron sacrificados a los 4 días (TMEV: n=10; Control: n=10), 10 días (TMEV: n=10; Control: n=10), 14 días (TMEV: n=7; Control: n=4) y 30 días (TMEV: n=8; Control: n=8) y los hipocampos procesados según el protocolo habitual. El análisis estadístico de los distintos experimentos reveló un descenso significativo para los animales a los 10 y 14 días post-infección (T-test (10 días), p<0.001; T-test (14 días), p<0.01). Los grupos 4 días post-infección y 30 días post-infección no presentaron diferencias significativas (T-test (4 días), p=0.18; T-test (30 días), p=0.17).

inyección del vehículo (DMEM + FCS al 10%) de volumen similar. Se estudió la modulación del receptor de IL-1 a los 4, 10, 14, 30, 50 y 100 días post-infección. La fig. 4.27. muestra la unión al receptor de IL-1 a los 4, 10, 14 y 30 días, observándose que se producía un descenso de la unión al receptor de IL-1 con [¹²⁵I]rhIL-1 α significativo a los 10 días (T-test, $p < 0.0001$) y a los 14 días (T-test, $p = 0.01$) post-infección. Las diferencias entre los animales inyectados con TMEV y los controles no fueron significativas ni a los 4 y ni a los 30 días post-infección. En la gráfica no aparecen los resultados correspondientes a los 50 y 100 días post-infección, donde tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos infectados y los controles.

En un siguiente grupo de experimentos, estudiamos si la disminución en la unión al receptor que habíamos observado los días 10 y 14 post-infección era un fenómeno específico de la infección por TMEV en una cepa susceptible de sufrir una desmielinización posterior o si podía observarse también en cepas resistentes. Se inyectaron intracerebralmente (i.c.) dos grupos de animales SJL/J ($n=6$) y BALB/cByJ ($n=5$) con 1×10^8 pfu/ml en $30 \mu\text{l}$ de DMEM + FCS 10%. Como control se usaron animales de la misma cepa y edad inyectados con vehículo únicamente. La fig 4.28. muestra el efecto de la infección por TMEV sobre la unión al IL-1R en ratones SJL/J, a los 10 días post-infección donde se produce un descenso significativo de la unión al receptor de IL-1 (T-test, $p < 0.001$). La fig. 4.29. muestra el efecto de la inyección i.c. de 1×10^8 pfu/ml en ratones BALB/cByJ; al contrario que en los ratones SJL/J, en una cepa resistente a la desmielinización por TMEV como los ratones BALB/cByJ, no se observaron variaciones significativas en la unión al receptor de IL-1 con [¹²⁵I]rhIL-1 α . Por tanto, se puede concluir que la disminución en la capacidad de unión de la IL-1 a su receptor parece ser específica de la infección por TMEV en cepas que son sensibles a la desmielinización inducida por dicho virus.

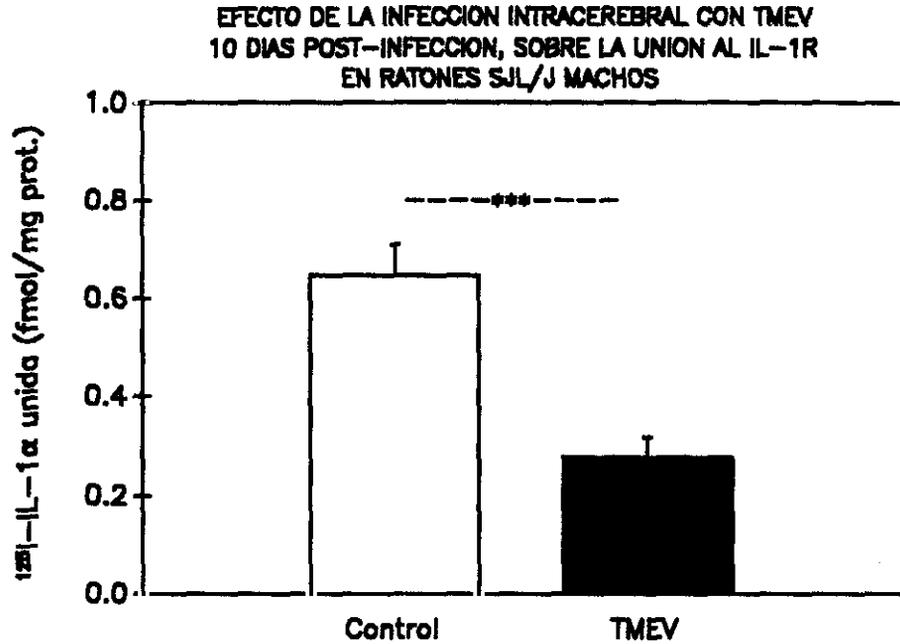


Fig. 4.28.: Efecto de la infección por TMEV en los ratones SJL/J 10 días post infección sobre la unión al receptor de IL-1 usando [¹²⁵I]rhIL-1α como ligando. Se inyectaron ratones SJL/J machos de 3-4 semanas de edad con 1x10⁸ pfu/ml de TMEV (n=10, vol: 30μl) y un segundo grupo de animales con el mismo volumen de vehículo como controles (n=10). Los animales se sacrificaron el día 10 post infección y los hipocampos se procesaron según el protocolo habitual. Los animales infectados presentaron un descenso significativo de la unión al receptor en relación con los controles (T-test, p<0.001).

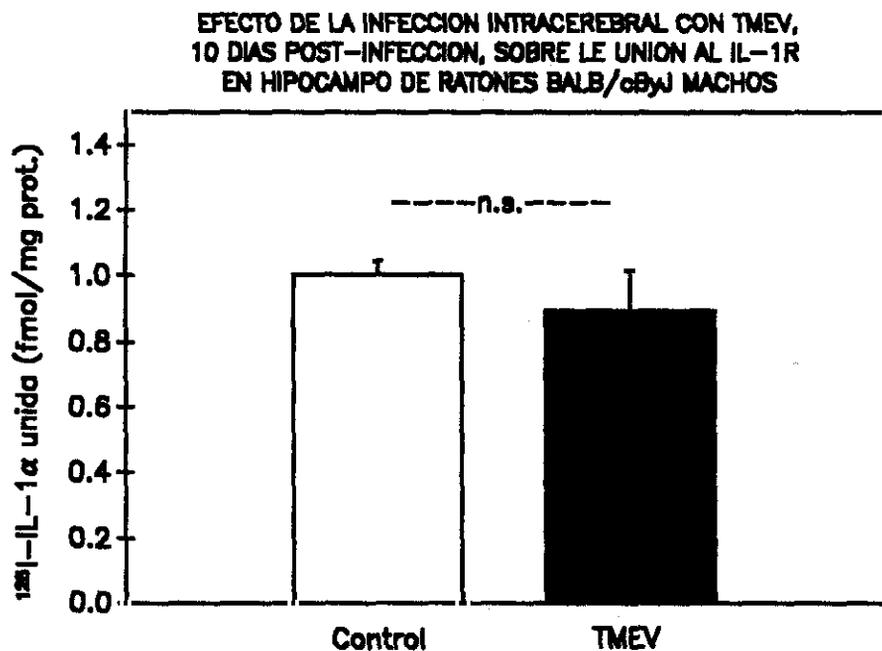
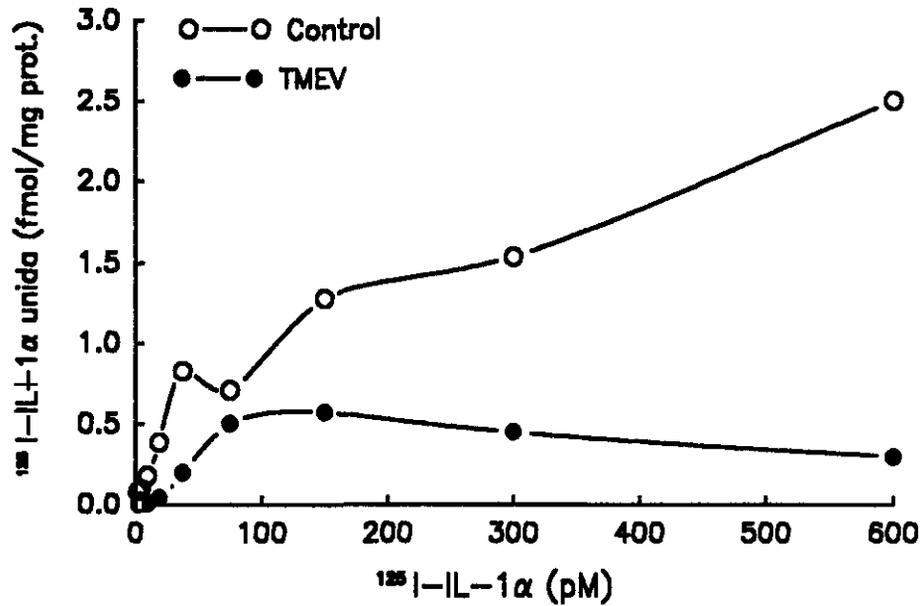


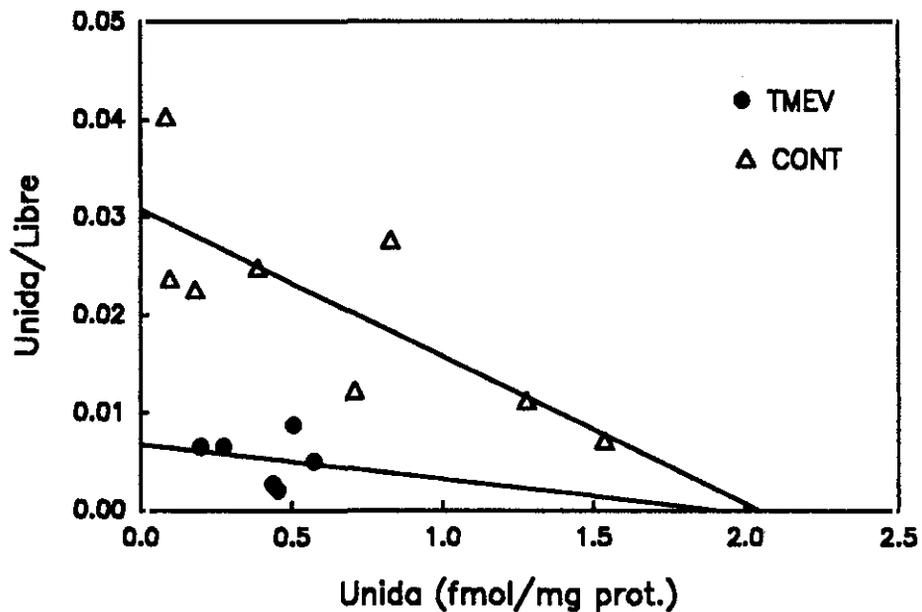
Fig. 4.29.: Efecto de la infección por TMEV en los ratones BALB/cByJ 10 días post infección sobre la unión al receptor de IL-1 usando [¹²⁵I]rhIL-1α como ligando. Se inyectaron ratones BALB/cByJ machos de 3-4 semanas de edad con 1x10⁸ pfu/ml de TMEV (n=6, vol: 30μl) y un segundo grupo de animales con el mismo volumen de vehículo como controles (n=4). Los animales se sacrificaron el día 10 post infección y los hipocampos se procesaron según el protocolo habitual. Los animales infectados no presentaron cambios significativos en la unión al receptor en relación con los controles (T-test, p=0.26).

Seguidamente estudiamos la cinética de dicha reacción para determinar si el descenso de dicha unión al receptor de IL-1 se producía por un cambio en el B_{max} o en la K_d de la reacción. Para ello se inyectaron dos grupos de animales, uno con 1×10^8 pfu/ml de TMEV (n=7) y un segundo grupo con un mismo volumen (30 μ l) del vehículo (DMEM + FCS 10%) únicamente. Los hipocampos de cada grupo fueron homogenizados conjuntamente y se ajustó la concentración de proteínas a 133 μ g/ml. Se realizaron estudios de saturación con concentraciones crecientes del ligando [125 I]rhIL-1 α de 2 a 600 pM. La fig. 4.30. muestra la diferencia de saturación entre los animales inyectados con TMEV y los controles, así como la representación de un Scatchard significativo. El B_{max} para los animales control tuvo un valor de 60 fmol/mg proteína y la K_d de dicha reacción fue de 10.59 pM. En los animales infectados el valor del B_{max} fue de 0.042 fmol/mg de proteína y de la K_d de 1.32 pM.

Finalmente estudiamos si la administración periférica de dexametasona era capaz de afectar la disminución de la unión al receptor de IL-1 inducida por TMEV. Para ello se inyectaron tres grupos de animales; el primer grupo (DMEM/Dex, n=4) recibió vehículo i.c. y DEX, i.p.; el segundo (TMEV/Sal, n=5) recibió TMEV i.c. y SAL i.p. y el tercer grupo (TMEV/Dex n=4) TMEV i.c. y DEX i.p. La dosis inyectada de TMEV fue de 1×10^7 pfu/ml y la de DEX de 0.5 mg/kg/12 horas disuelto en salino estéril con 2% de etanol. Los animales control recibieron un volumen similar del vehículo. Los animales comenzaron a recibir SAL o DEX i.p., 5 días después de ser inyectados i.c. y todos ellos fueron sacrificados 10 días después de la inyección. Los hipocampos se procesaron según el protocolo habitual y se ajustaron a una concentración de proteínas de 133 μ g/ml. La fig. 4.31. muestra que la inyección de TMEV i.c en el grupo que recibió SAL i.p. (TMEV/Sal) producía un descenso significativo de la unión al receptor de IL-1,



a).



b).

Fig. 4.30.: Efecto de la infección por TMEV sobre la saturación y cinética del receptor de IL-1 en hipocampo de ratón SJL/J macho. **a:** Curva de saturación de los niveles de unión específica al receptor de IL-1 a concentraciones crecientes de [^{125}I]rhIL-1 α en animales infectados con 1×10^8 pfu/ml de TMEV y en animales inyectados con el mismo volumen (30 μl) de vehículo. Membranas de 7 hipocampos de animales infectados o controles ajustados a una concentración fija de proteínas de 133 $\mu\text{g/ml}$ se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de ligando (2-600 pM). La figura muestra el resultado de un experimento significativo. **b:** representación del scatchard del experimento anterior, donde se demuestra una disminución muy significativa de la afinidad del IL-1R por su ligando tras la infección por TMEV en relación con los controles. En los controles el B_{max} tuvo un valor de 0.60 fmol/mg prot con un K_d 10.59 pM. En los animales infectados los valores fueron para el B_{max} de 0.042 fmol/mg prot y para la K_d de 1.32 pM respectivamente.

frente a los controles (DMEM/Dex). Dicho descenso, al contrario de lo que ocurría con la administración de DEX tras LPS (ver apartado 4.4 y Fig. 4.19), es revertido con la administración de DEX i.p. (TMEV/Dex) hasta valores basales (ANOVA $F_{2,10} = 7.436$ $p < 0.01$; post-hoc Tukey-B test: TMEV/Sal < DMEM/Dex, $p < 0.05$; TMEV/Sal < TMEV/Dex, $p < 0.05$). El análisis de los tres grupos por separado mediante T-test independientes, comparando DMEM/Dex y TMEV/Dex frente a TMEV/Sal, fue igualmente significativo (T-Test TMEV/Sal < DMEM/Sal: $p < 0.05$; T-Test TMEV/Sal < TMEV/Dex: $p < 0.05$).

EFFECTO DE LA DEXAMETASONA SOBRE LA MODULACION DEL IL-1R INDUCIDA POR LA INYECCION I.C. DE TMEV

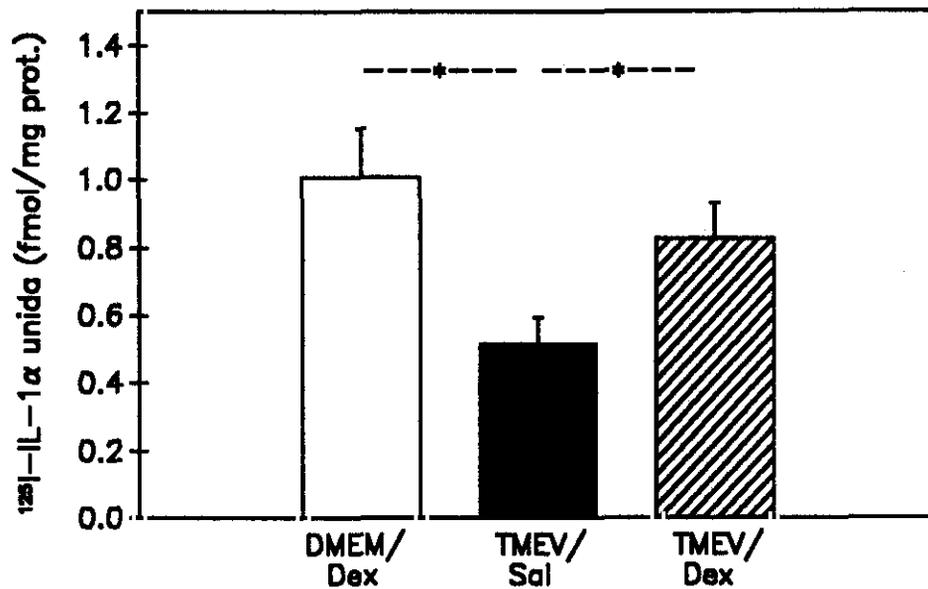


Fig. 4.31.: Efecto de la DEX sobre la modulación del IL-1R producida por la infección por TMEV. Se inyectaron i.c. ratones SJL/J bien con 1×10^7 pfu/ml de TMEV o con un volumen similar ($30 \mu\text{l}$) del vehículo (DMEM). El día 5 post-infección algunos grupos comenzaron a recibir por vía i.p. bien DEX ($500 \mu\text{g}/\text{kg}/12 \text{ h}$) o vehículo (SAL) en pauta similar. Los animales fueron sacrificados al día 10 post-infección y los hipocampos procesados según el protocolo habitual, usando como ligando [¹²⁵I]rhIL-1 α . El grupo infectado con el virus y que recibió SAL i.p. (TMEV/Sal; n=6) presentó un descenso significativo de la unión al receptor de IL-1 respecto al grupo control (DMEM/Dex; n=5) (T-test: $p < 0.05$). En los animales infectados, pero que recibieron DEX i.p. (TMEV/Dex; n=6), el descenso de la unión al IL-1R observado en el grupo TMEV/Sal revirtió (T-test, $p < 0.05$) igualándose nuevamente su nivel de unión al receptor con el grupo control (DMEM/Sal).

5.- DISCUSION

5.-DISCUSION

Hemos subdividido este trabajo en cuatro apartados principales. En la primera parte se ha tratado de localizar y caracterizar al receptor de interleucina-1 (IL-1R) en hipocampo e hipotálamo de ratones BALB/c y SJL/J y de rata Wistar. En la segunda parte se estudió la posible modulación de dicho receptor a través del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal (H-H-A), manipulando la actividad del eje, bien por exceso, administrando glucocorticoides exógenos y utilizando distintos modelos de estrés o bien por defecto mediante técnicas de manipulación neonatal (*handling*) o mediante adrenalectomía. La tercera parte trata sobre el estudio de la modulación del IL-1R a través de la administración periférica de lipopolisacárido (LPS), una endotoxina bacteriana capaz de producir la liberación de IL-1 desde macrófagos en sangre periférica, así como el efecto de los glucocorticoides sobre dicha modulación. En la cuarta y última parte se estudió el comportamiento de dicho receptor en un proceso patológico que afectase al SNC e indujese la liberación intracerebral de IL-1. La Esclerosis Múltiple (EM), una enfermedad autoinmune, donde se produce una destrucción parcheada de la mielina dentro del SNC, mediada por citocinas (sobre todo IL-1, TNF α e IFN-g), era posiblemente una de las alteraciones neurológicas más adecuadas a estudiar en este contexto. La otra gran ventaja que ofrecía la EM es que de ella existen modelos animales ampliamente estudiados. Nosotros elegimos un modelo inducido por la inyección intracerebral de un picornavirus, del género cardiovirus, el virus de Theiler (TMEV). Este virus induce una enfermedad bifásica caracterizada inicialmente por la invasión de neuronas, sobre todo en hipotálamo, hipocampo, tronco cerebral y médula, produciendo lesión y muerte neuronal tras un periodo de incubación de pocos días. Tras esta primera fase, en los animales que sobrevivan, o en aquellos en los que se inyecte un virus atenuado, aparecerá, tras una incubación de dos a tres meses, una desmielinización mediada por

mecanismos inmunes de características similares a las de la EM (Friedmann, 1985).

1.) LOCALIZACION Y CARACTERIZACION DEL IL-1R EN CEREBRO

1.1.) CARACTERISTICAS GENERALES DE LA UNION AL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOCAMPO DE RATON

Estudios recientes han identificado la presencia de un receptor específico para IL-1 (IL-1R) de alta afinidad en el hipocampo de ratones (Haour y col, 1990; Takao y col, 1990; Ban y col, 1991). Nuestros primeros experimentos estuvieron encaminados a la puesta a punto del método y a la caracterización de dicho receptor en nuestras condiciones, usando como ligando [¹²⁵I]rhIL-1 α . Para ello lo primero que hicimos fue localizar mediante técnicas de unión al receptor dicho receptor en el hipocampo de ratón y estudiar sus características. Se estudiaron inicialmente las condiciones idóneas para nuestro método, objetivándose que a mayor concentración de proteínas obteníamos un mayor grado de unión al receptor. Sin embargo, a partir de una concentración de 400 μ g de proteínas en el tubo (133 μ g/ml), la unión específica se saturaba, produciéndose el aumento en la unión total, sólo a costa de un incremento en la unión no específica. El porcentaje de unión específica era aproximadamente un 50% de la unión total y comparable con otro grupo que había trabajado en condiciones parecidas (Takao y col, 1990).

El estudio del tiempo de incubación a temperatura ambiente demostró que los valores de unión específica eran máximos a las tres horas de incubación y que a partir de ahí estos valores alcanzaban una plataforma con niveles para la unión específica de aproximadamente un 50-60%. La incubación a 4°C durante 12, 18 ó 24 horas condujo a valores similares de unión específica a partir de las 18 horas

(50% de unión específica), pero no mejoró los resultados obtenidos a temperatura ambiente y en tiempos de incubación más breves.

Se estudiaron diferentes cepas de ratones para analizar si existían diferencias en la unión al receptor dependiendo de la especie. Se estudió la unión al receptor de [¹²⁵I]rhIL-1 α en las cepas BALB/c, Swiss, C3H, SJL/J y C57. Todas ellas tuvieron valores similares de unión específica al receptor para una misma concentración de proteínas. Se eligieron para el estudio los ratones de la cepa BALB/c por dos motivos. En primer lugar por que teníamos un fácil acceso a ellos, pues se crían en el propio Instituto Cajal y, en segundo lugar, porque en la cuarta parte de este trabajo, íbamos a estudiar un modelo de EM inducido por la inyección del virus de Theiler (TMEV) en ratones de la cepa SJL/J y los ratones BALB/c (subcepa ByJ), resistentes a ser infectados por el TMEV, nos iban a servir de animales control para los SJL/J. Por otra parte nuestros datos demostraban que no existían diferencias entre las distintas cepas de ratones estudiadas, lo que no había sido analizado de forma sistemática previamente.

Una vez elegida la cepa BALB/c se estudió si existía diferencia en cuanto a los ensayos de unión al receptor de IL-1 entre machos y hembras. Aunque el valor de la unión específica en BALB/c hembras fue ligeramente superior, que en los machos dicha diferencia no alcanzó significación estadística. El estudio de la cinética del receptor, tanto en machos como en hembras, tuvo valores similares tanto de B_{max}, como de K_d. Se usaron ratones machos al no presentar variaciones hormonales en relación con el ciclo menstrual, que pudieran interferir con los estudios de los corticosteroides.

1.2.) VARIACIONES EN LA UNIÓN AL RECEPTOR EN FUNCIÓN DEL USO DE DIFERENTES FORMAS DE IL-1 COMO LIGANDO

Los estudios de unión al IL-1R usando distintas formas de IL-1 son contradictorios en la literatura. En ratones parece que usando tanto IL-1 α como IL-1 β (recombinante humana o murina) como ligando, se detecta un sitio de unión en el SNC con distintas afinidades según el ligando utilizado. Los estudios en SNC de rata son mucho más confusos. Así algunos autores describen un punto de unión específica de alta afinidad utilizando IL-1 β , (Farrar y col, 1987; Katsuura y col, 1988), mientras que otros laboratorios (Haour y col, 1990; Takao y col, 1990, Ban y col, 1991, Takao y col, 1993) son incapaces de detectar unión al receptor de IL-1 en SNC de rata en condiciones similares a las descritas por Farrar y Katsuura. Nosotros decidimos estudiar cual eran las variaciones en la unión al IL-1 R, que obteníamos, tanto en hipocampo como en hipotálamo, usando como ligando distintas IL-1 con nuestro método.

1.2.1 Hipocampo de ratón

En los primeros experimentos para caracterizar el IL-1R se usó como ligando [¹²⁵I]rhIL-1 α (ver Discusión apdo 1.1.). Seguidamente se realizaron experimentos con IL-1 β , en vez de IL- α , para determinar la cinética del receptor de IL-1 en hipocampo de ratón con esta molécula. En el cerebro, IL-1 α e IL-1 β son igualmente potentes en su competencia por el IL-1R cuando se realizan estudios de cinética del receptor con ligandos radiyodados (Katsuura et al., 1988.). Nosotros usamos IL-1 β recombinante humana y IL-1 β recombinante murina. Ninguna de las dos moléculas de IL-1 β produjo unos valores de unión específica mejores que con [¹²⁵I]rhIL-1 α en hipocampo de ratón. Sin embargo la afinidad por el receptor con [¹²⁵I]rhIL-1 β fue de 6.5 veces menor y con [¹²⁵I]rmlL-1 α de 1.4 veces menor, que con rhIL-1 α , datos que coinciden con los observados por otros grupos (Ban et al., 1991; Takao et al., 1990).

La mayor afinidad que muestra la IL-1 α por el IL-1R en relación con la IL-1 β , ha sido atribuida a una mayor pérdida de actividad biológica, de la IL-1 β con el marcaje con ¹²⁵I. Por el contrario, la IL-1 α toleraría mejor dicho marcaje conservando su actividad biológica casi intacta (Dower y col, 1986). Por tanto, no puede deducirse, al menos a través de métodos de unión al receptor, que la IL-1 α tenga mayor afinidad por el receptor de IL-1 que la IL-1 β . Además, a la vista de las múltiples acciones que sobre el SNC tiene la IL-1 (Rothwell, 1991), de la existencia de varios tipos de IL-1R (Dinarello, 1991; Cunningham y De Souza, 1993) y de la mayor afinidad de la IL-1 α por los IL-1R tipo I y de la IL-1 β por los tipo II (Scapigliati y col 1989; Dinarello, 1991; Takao y col, 1993), no es posible descartar, que en otras condiciones experimentales, pueda detectarse un lugar de unión de alta afinidad para IL-1 β en hipocampo de ratón.

1.2.2. Hipocampo de rata

El siguiente paso fue tratar de localizar en hipocampo de rata dicho receptor. Usando técnicas de autorradiografía y un análogo de IL-1 α recombinante murina marcado con ¹²⁵I como ligando, Farrar y col (1987) detectaron mediante densitometría, niveles altos de IL-1R en hipocampo de rata Sprague-Dawley. Por el contrario, recientemente, Takao y col (1993) encontraron niveles mínimos de unión al receptor de IL-1 en hipocampo de rata usando como ligandos marcados con ¹²⁵I, rhIL-1 α , rhIL-1 β , rmIL-1 α e IL-1 β recombinante de rata.

En nuestros experimentos los valores de unión específica obtenidos en hipocampo de rata estuvieron entre un 10% y un 15%, utilizando diferentes protocolos de purificación de membranas, para conseguir disminuir al máximo la unión inespecífica a otras proteínas. Se usaron varias formas de IL-1 (rhIL-1 α , rhIL-1 β y rmIL-1 β) como ligando radioactivo con la intención de descartar que el

receptor en la rata tuviese una mayor especificidad por su unión al ligando, que en el ratón. Sin embargo, basandonos en nuestros datos y en los descritos por el grupo de De Souza (Takao y col, 1993), que usó además IL-1 β recombinante de rata, no parece que la ausencia de unión al receptor de IL-1 de los distintos ligandos utilizados vaya a ser debida a problemas de diferencias de afinidad por ligandos no específicos, sino por la probable existencia de diferencias en las características y localización del IL-1R entre las diferentes especies (ratón y rata). La ausencia de unión al receptor tanto con [¹²⁵I]rhIL-1 α , [¹²⁵I]rhIL-1 β y [¹²⁵I]rmIL-1 β , así como con [¹²⁵I]IL-1 β de rata, este último dato obtenido por el grupo de De Souza (Takao y col, 1993) en hipocampo, así como en otros tejidos, de rata no deja de ser sorprendente, sobre todo teniendo en cuenta la variedad de efectos que la IL-1 β produce en la rata (Berkenbosch y col, 1987; Sapolski y col, 1987; Uehara y col, 1987; Hellerstein y col, 1989; Uehara y col, 1989; Katsuura y col, 1990; Rivier y Wale, 1990; Opp y col, 1991). Dado el alto grado de homología entre las moléculas de IL-1 β humana, murina y de rata (Eisenberg y col, 1991), parece poco probable que la ausencia de detección de un IL-1R en rata sea debido a los ligandos. Por el contrario, se podría especular que los efectos que la IL-1 β produce en la rata podrían estar mediados por un subtipo de receptor distinto a los conocidos tipo I y tipo II, que precisaría unas condiciones experimentales distintas a las utilizadas por nosotros para ser detectado.

1.2.3. Hipotálamo de ratón

Se estudió seguidamente la presencia de IL-1R en hipotálamo de ratón. Si bien varios autores habían detectado dicho receptor en el hipotálamo de la rata usando técnicas de autorradiografía (Farrar y col, 1987) o técnicas de unión al receptor (Katsuura y col, 1988) nuestros datos coinciden con otros autores, que no son capaces de replicar los experimentos de Katsuura y Farrar, usando autorradiografía (Haour y col, 1990; Ban y col, 1991) o que lo encuentran en muy

bajas concentraciones en ratones usando técnicas de unión al receptor (Takao y col, 1990). En cifras porcentuales Takao y col (1991) encuentran en hipotálamo de ratón aproximadamente un 16% de la unión específica obtenidos en hipocampo. En nuestros experimentos se obtuvieron porcentajes entre un 8% y un 16% dependiendo de la concentración de proteínas/tubo utilizadas. Estos datos coincidirían con los datos descritos por el grupo de De Souza. Las diferencias entre unos grupos y otros podrían deberse a diferencias inter-especie, ya que el grupo de De Souza y nosotros estudiamos el IL-1R en ratón y Farrar y Kaatsura en rata. Sin embargo la coincidencia de otros autores en no detectar IL-1R en ningún tejido en rata con IL-1 α y β recombinantes de diferentes procedencias (Takao y col, 1993) hace que los resultados de Kaatsura y Farrar deban tomarse inicialmente con cierta precaución.

Por otro lado la dificultad para detectar IL-1R en hipotálamo suscita la polémica de como activaría la IL-1 la secreción de CRF desde el hipotálamo. Es conocido que el hipocampo es un lugar donde se co-localizan en mayor densidad IL-1R y receptores para los glucocorticoides (GC-R) (McEwen y col, 1986, Cunningham y De Souza, 1993). Además, desde el hipocampo se ejerce un control tónico inhibitorio sobre la secreción de ACTH (Sapolski y col, 1986; Dallman y col, 1989; Sapolski, 1992). Cabe por tanto la posibilidad de que el efecto de la IL-1 sobre el eje H-H-A se ejerciera en parte a nivel del hipocampo a través de un bloqueo de la inhibición tónica que éste ejerce sobre la secreción de ACTH. Es posible también que, como mantiene el grupo de Arimura, la IL-1 actuase sobre un IL-1R localizado en los astrocitos de las zonas del SNC que carecen de BHE, como el OVLT, y que dichos astrocitos liberasen una molécula intermediaria, que podría ser la PGE₂ o la PGF_{2 α} . Estas PGs actuarían sobre neuronas del area preóptica del hipotálamo, que a su vez estimularían a las neuronas secretoras de CRF del nucleo paraventricular hipotalámico (Gottschall y col, 1992). En nuestro laboratorio se ha demostrado que el uso de un inhibidor de

la ciclooxigenasa, como la indometacina, bloquea la secreción de CRF hipotalámico inducido por IL-1 (Cambroner y col 1992b). Igualmente se ha observado que la administración de PGF2 α es capaz de estimular en una forma dosis dependiente la secreción de CRF hipotalámico (Cambroner y col 1992b). Ambos datos podrían apoyar la teoría de que el efecto de la IL-1 sobre el CRF se realizaría a través de un mecanismo que requiere la presencia de varias moléculas intermediarias.

Es posible también que en el hipotálamo, donde existe *in vivo* una elevada concentración basal de IL-1 (Breder y col, 1988; Lechan y col, 1990), ésta actuase como ligando endógeno, bloqueando la mayoría de los receptores para IL-1, no permitiendo al ligando marcado unirse en un número suficientemente alto de receptores libres, como para permitir su detección por técnicas de unión al receptor.

Finalmente, datos muy recientes parecen hacer más probable la existencia de un nuevo subtipo de IL-1R distinto a los tipo I y II, no caracterizado hasta ahora, que podría ser responsable de los efectos de la IL-1 sobre el SNC de la rata (Takao y col, 1993) y que, a lo mejor, podría mediar los efectos de la IL-1 en el hipotálamo de ratón.

1.3.) CARACTERISTICAS CINETICAS DEL RECEPTOR DE INTERLEUCINA-1

Se han descrito y clonado 2 tipos de IL-1R. El tipo I, también conocido como tipo A (IL-1RtI o IL-1RtA) tiene un peso molecular de 80 kD y se localiza fundamentalmente en linfocitos T, fibroblastos y células endoteliales. El tipo II, también conocido como tipo B, (IL-1RtII o IL-1RtB) tiene un peso molecular de 68 kD y se localiza fundamentalmente en neutrofilos y macrófagos (Chizzonite et al.,

1989). IL-1 α e IL-1 β se unen tanto al IL-1RtI, como al IL-1RtII. Si bien la afinidad de ambas moléculas es comparable para el IL-1RtI, la IL-1 β parece tener una mayor afinidad por los IL-1RtII (Dinarello, 1991). Esto puede explicar, al menos en parte, los resultados obtenidos con ligandos radioactivos tanto con IL-1 α , como con IL-1 β . En SNC, el IL-1R detectado hasta la fecha tiene características en la unión al receptor similares a las descritas para los receptores presentes en los linfocitos T, es decir IL-1RtI. Por otro lado, estudios por hibridación "in situ", han detectado la expresión de mRNA para el IL-1RtI en cerebro de ratón (Cunningham et al, 1992; Deyerle et al, 1992). Finalmente, parece ser que, al menos en sangre periférica, de ambos tipos de IL-1R solamente el IL-1RtI sería capaz de transmitir una señal al interior de la célula. Por otro lado, el IL-1RtII, con una región intracitoplásmica mucho menor (29 aminoácidos), no parece ser un receptor funcional. Es más, algunos autores consideran que es un sistema de control negativo para el IL-1RtI, que modularía los efectos del receptor tipo I, al competir por la unión con la IL-1 α o β (Colotta et al., 1993). Según estos mismos autores, determinadas agentes como la dexametasona o la IL-4 modularían los efectos de la IL-1 induciendo la expresión de IL-1RtII y con ello disminuyendo la acción de la IL-1, al menos en sangre periférica (Colotta et al., 1993). En SNC, estos datos no han sido corroborados por todos los grupos, y así algunos autores usando técnicas de rtPCR no han sido capaces de detectar mRNA de IL-1RtI en cerebro (Ban et al., 1992), mientras otros autores, como se ha citado previamente, si los han detectado (Cunningham y col, 1992).

El IL-1R detectado por nosotros por técnicas de unión al receptor debe corresponder a un IL-1RtI, al coincidir en sus características cinéticas con los datos obtenidos por el grupo de De Souza (Takao et al., 1990) y la distribución y concentración del IL-1R obtenida por estos autores por técnicas de unión al receptor usando como ligando [¹²⁵I]IL-1 α es superponible a la que obtuvieron por hibridación *in situ* usando una sonda para IL-1RtI (Cunningham y col, 1992).

2.) MODULACION DEL RECEPTOR DE IL-1 A TRAVES DE LA MANIPULACION DEL EJE H-H-A.

Es conocido en la actualidad que la IL-1 es capaz de activar el eje H-H-A, fundamentalmente aumentando la secreción de CRF hipotalámico (Besedovski y col, 1986; Sapolski y col, 1987; Berkenbosch y col, 1987; Cambroner y col, 1989; Saperstein y col, 1992; Watanobe et al., 1993). Además es posible que la IL-1 pueda actuar sobre la hipófisis favoreciendo la secreción de ACTH (Woloski y col, 1985; Basedovski y col, 1986; Katsuura y col, 1988b; Cambroner y col, 1992a) o de glucocorticoides directamente desde las glándulas adrenales (Roh y col, 1988; Whitcomb y col, 1988; Winter y col, 1990; Andreis y col, 1991; Tominaga y col, 1991). Dicha activación del eje H-H-A por parte de las citocinas formaría la vía aferente de un circuito de retroalimentación inmuno-neuro-endocrino. La parte de este circuito que se extiende desde el SI hasta el SNC y mediada fundamentalmente por citocinas como la IL-1, es poco conocida, especialmente a nivel de sus receptores en el SNC. Es decir, la pregunta que surge de forma obvia es si los glucocorticoides, producto final de la activación del eje H-H-A, controlan de algún modo la secreción de las citocinas y/o expresión de sus receptores en el SNC. En sangre periférica los glucocorticoides disminuyen la síntesis y liberación de IL-1 y además producen un incremento en el número de IL-1R por célula, tanto en células de sangre periférica (Akahoshi y col, 1988), como en fibroblastos (Mizel y col, 1987). Sin embargo, la modulación de los IL-1R en el SNC a través de los glucocorticoides es actualmente desconocida. Por este motivo comenzamos el estudio de la modulación de dicho receptor, por medio de distintas manipulaciones del eje H-H-A, sometiendo a los animales a distintos tratamientos corticosteroideos.

La administración de DEX o CORT en forma aguda no induce cambios en el nivel de unión al receptor de IL-1 en hipocampo de ratón precisando la

existencia de niveles plasmáticos de corticosteroides elevados durante dos días, al menos, para que se produzcan variaciones en el IL-1R. Las acciones de los glucocorticoides, clásicamente, se han descrito como efectos genómicos, que requieren que el corticosteroide se una a un receptor nuclear y active un gen (Gustafsson, 1987). Este mecanismo de acción suele precisar un cierto tiempo antes de que se produzca un efecto fisiológico, aunque en algunas ocasiones pueden producirse efectos por vía genómica en tiempos muy breves. Por otro lado, recientemente, se han descrito efectos producidos por los glucocorticoides actuando sobre sitios de unión en la membrana (Schumacher, 1990; Orchinik, 1991, Chen y col, 1993). En estos casos la transducción de la señal podría producirse en muy poco tiempo, atribuyéndose a este tipo de receptores de membrana los efectos de los GC que se observan segundos o minutos después de su administración. La ausencia de efecto de los GC, tanto "in vivo" poco tiempo después de ser inyectados por vía i.p., como "in vitro" en incubaciones cortas sobre rodajas de hipocampo, nos permite suponer que se precisa un tiempo de tratamiento prolongado para inducir cambios significativos en el IL-1R. Por otro lado la ausencia de variaciones tras incubaciones con GC utilizando homogenizados de membrana parece indicar que es preciso la integridad celular para que dicha modulación se produzca. Todos estos datos muestran que los glucocorticoides, en principio, modularán la unión de la IL-1 al IL-1R tras un periodo de tiempo prolongado de exposición y, probablemente, siguiendo su vía clásica a través de su receptor citosólico.

En aquellos experimentos donde se permitió que los GC actuaran durante un periodo de tiempo más prolongado se observó, que tanto la DEX, como en algunos casos la CORT, eran capaces de disminuir el grado de unión de la IL-1 a su receptor usando distintos ligandos marcado. La DEX demostró ser más eficaz en este cometido, pues produjo descensos significativos a dosis bajas y altas y en tratamientos subcrónicos y crónicos. Por el contrario la CORT, el corticosteroide

natural, sólo tuvo efecto sobre la unión al IL-1R con las dosis mayores utilizadas en tratamientos subcrónicos y únicamente si se usaba la rhIL-1 α como ligando. Esta última, como se ha comentado previamente, es el ligando de mayor afinidad por el IL-1R de todos los usados. De todas formas es necesario señalar que el descenso de la unión al IL-1R inducido por los GC en ningún caso fue superior al 34% y aunque alcanzó significación estadística, es poco probable que conlleve un efecto fisiológico en un sistema que presenta un escaso número de receptores por célula y donde sólo es necesaria la ocupación de un porcentaje bajo de estos receptores para producir la traducción de una señal y con ello una respuesta fisiológica (Dinarelli, 1991).

Así los estudios de saturación demostraron que los pequeños cambios detectados para la CORT y los cambios observados con el tratamiento con DEX no se traducían en variaciones significativas del B_{max} o la K_d . Esto es algo habitual en este tipo de experimentos, donde se requieren descensos mayores en los estudios de punto único, para modificar de forma significativa los valores de B_{max} y K_d .

Sin embargo, los GC han producido variaciones en el número de IL-1R en otros sistemas previamente estudiados. Así, en células del sistema inmune en sangre periférica (Akahoshi y col, 1988; Scapigliati y col, 1989) y en una línea celular de un tumor pituitario (Webster y col, 1991), los GC indujeron un incremento del número de IL-1R sin modificar su K_d . Este aumento en el número de receptores puede explicarse por la disminución que los propios GC producen en la liberación su ligando, es decir de la IL-1 (Guyre y col, 1988). Además, los GC podrían producir *per se* un incremento en la síntesis de IL-1R induciendo la activación de factores de transcripción para el IL-1R en células de sangre periférica (Barnes y Adcock, 1993).

El mecanismo por el que los GC producen un descenso limitado de los IL-1R en el hipocampo es algo más complejo de explicar, pues los mecanismos de represión génica inducidos por glucocorticoides son menos conocidos y su naturaleza exacta queda por determinar. Los GC son capaces de inhibir la síntesis de otros receptores de citocinas como el IL-2R (Grabstein y col, 1986). Es igualmente conocido que en queratinocitos los GC inducen la síntesis de IL-1ra, que competiría con la IL-1 por la unión al IL-1R (Stosic-Grujicic y Lukic, 1992). Si el descenso en la unión de la IL-1 α al IL-1R inducido por los GC en el hipocampo de ratón es debida a un aumento en la síntesis de IL-1ra deberá establecerse en un futuro.

Sin embargo, en este contexto es interesante resaltar que, también recientemente, se ha descrito que en monocitos, contrariamente a los que sucede en los queratinocitos, los GC suprimen la síntesis tanto de mRNA de IL-1 como de IL-1ra, en respuesta a la administración de una endotoxina (Artz y col, 1994). Aunque los efectos sobre queratinocitos y monocitos parecen aparentemente contradictorios ambos efectos pueden ser compatibles, al tratarse de sistemas celulares diferentes, donde pueden existir interacciones con otros factores de transcripción distintos para cada tipo celular, que a su vez modularían, incluso de manera opuesta, los efectos del complejo GC+GC-R sobre los elementos de respuesta a GC (*glucocorticoids response elements* o GREs) localizados en el DNA (Barnes y Adcock, 1993). Esta variación en los efectos de los GC dependiendo del tipo celular sobre el que actúen, podría servir también como posible explicación a las diferencias observadas en el comportamiento de los IL-1R de sangre periférica o de líneas celulares hipofisarias (un aumento de IL-1R inducido por GC) y en hipocampo (un mínimo descenso de IL-1R inducido por GC) tal como hemos comprobado nosotros.

En resumen, nuestro estudio parece indicar que la administración de

glucocorticoides de forma subaguda o crónica inducen un pequeño descenso de la unión al receptor de IL-1. La DEX, un glucocorticoide sintético con un efecto antiinflamatorio mucho mayor que la CORT, resultó más efectivo en modular el IL-1R que la CORT. Sin embargo estos cambios no fueron suficientemente amplios como para que se reflejasen en los estudios de saturación, donde ninguno de los dos glucocorticoides estudiados fue capaz de modificar significativamente los valores de B_{max} o K_d . Todos estos datos parecen pues indicar, que al contrario de lo que ocurre en sangre periférica, el SNC es mucho más resistente a modular la expresión del receptor de IL-1 en condiciones fisiológicas a través de la administración exógena de corticosteroides y que los niveles de descenso observado difícilmente tendrán traducción fisiológica en este sistema.

Es bien sabido que los animales sometidos a situaciones de estrés incrementan la actividad del eje H-A-A y por tanto aumentan los niveles de ACTH y CORT circulante. Para estudiar los efectos del estrés sobre los receptores centrales de IL-1 se sometió a los animales a diversos paradigmas bien caracterizados en nuestro laboratorio (Borrell y col, 1980, Torrellas y col, 1980, Sandi y col, 1992a, Sandi y col, 1992b). Tanto el estrés térmico, a través de la exposición al frío en animales que no hibernan (Selye, 1976a), como el estrés acústico (Selye, 1976b; Borrell y col, 1980), como el shock eléctrico inescapable (Selye 1976c) producen una activación del eje H-H-A e incrementos en los niveles de ACTH y CORT. Sin embargo, en nuestro trabajo ninguno de los distintos modelos de estrés utilizado produjo una modulación del IL-1R en el hipocampo de ratón. Este fenómeno podría ser debido a que el incremento transitorio en los niveles de CORT fue insuficiente para modular dicho receptor, pues ya hemos demostrado que, niveles de CORT similares a los observados en situaciones de estrés, sólo administrados i.p en pauta subcrónica disminuyen ligeramente los niveles de unión al IL-1R en hipocampo y en cualquier caso siempre de forma mucho menos drástica que la DEX. Otra posible explicación

para la marcada falta de efecto del estrés en la modulación del IL-1R en hipocampo, podría estar en relación con la reciente descripción de que, el estrés por inmovilización en ratas induce mRNA para IL-1 β sólo en hipotálamo, sin que se detectase inducción mRNA para IL-1 en otras regiones del SNC incluyendo el hipocampo (Minami y col, 1991). Este dato podría indicar que la respuesta al estrés podría estar mediada, en parte, directamente a través del hipotálamo desde vías catecolaminérgicas procedentes de núcleos del tronco cerebral sensibles a la IL-1 (Ericsson y col, 1994), sin directa participación de vías hipocampales. Por otro lado es también sabido, que la activación del eje H-H-A a través de la IL-1 se realiza por un mecanismo que es inhibido por indometacina, mientras que la activación de dicho eje secundaria al estrés no se inhibe por esta sustancia (Katsuura y col, 1988, 1990).

Tras los experimentos en los que se aumentaron los niveles de GC circulantes para valorar su efecto sobre el IL-1R, decidimos comprobar cual era el efecto de la disminución de los GC circulantes. La manipulación neonatal de las crías de ratón durante los primeros 21 días de vida (*handling*) produce cambios en el funcionamiento del eje H-H-A, que persisten toda la vida. Estos cambios se caracterizan por un incremento de los GC-R en el hipocampo (Meaney y col, 1988; Meaney y col, 1989), aumentando la sensibilidad de los animales a los niveles circulantes de glucocorticoides. En la edad adulta los animales manipulados, presentan niveles basales circulantes de GC menores y secretan menos GC tras recibir un estímulo estresante.

En animales adultos manipulados (*handled*) en la época postnatal, no se objetivaron diferencias en la unión al receptor de IL-1 en hipocampo. A pesar de existir niveles basales de GC mas bajos y una menor secreción de CORT en respuesta al estrés, no se observaron cambios en los estudios del IL-1R en hipocampo. Del mismo modo la ausencia total de glucocorticoides tras realizar

una adrenalectomía en los animales no indujo variaciones en la unión de la IL-1 a su receptor ni a los dos ni a los siete días después de la intervención.

Parece claro, que tanto el aumento como la disminución o incluso ausencia de glucocorticoides, no son factores esenciales en la regulación del IL-1R en hipocampo, donde no modificarán significativamente su número o su afinidad. Estos datos coinciden con otros grupos, donde en ratones no se observaron variaciones en el número de IL-1R tras someter a los animales a una hipofisectomía (Takao y col, 1990). La ausencia de modificaciones en los IL-1R en el hipocampo no deja, sin embargo, de ser sorprendente, considerando que dichos IL-1R se localizan en la capa de células granulares del giro dentado (Haour y col, 1990; Takao y col, 1990; Ban y col, 1991; Cunningham y col, 1992). Esta región ha demostrado ser extremadamente sensible a la ausencia de glucocorticoides, produciéndose a los pocos días de realizar una ADX una atrofia y posterior muerte masiva de neuronas (Sloviter y col, 1989; Gould y col, 1990), que es reversible con la administración exógena de glucocorticoides (Sloviter y col, 1989). Si los IL-1R se encuentran sobre todo en neuronas del giro dentado como mantiene diferentes grupos (Takao y col, 1990; Haour y col, 1990), es sorprendente que la unión al IL-1R no se afecte, salvo que dichos receptores se localicen principalmente en glía.

3.) MODULACION DEL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOCAMPO DE RATON BALB/c MEDIANTE LA ADMINISTRACION PERIFERICA DE LIPOPOLISACARIDO

El lipopolisacárido (LPS) es un glicolípido complejo, que forma parte de la pared bacteriana de las bacterias GRAM negativas. El interés en torno a esta molécula se centra en que es responsable de la respuesta clínica en el shock

séptico. Además, es un poderoso activador del sistema inmune tanto "in vivo", como "in vitro". La inyección periférica de LPS produce un incremento de la liberación de IL-1 desde monocito-macrófagos periféricos (Bone, 1991). Igualmente se ha descrito que la inyección de LPS periférica es capaz de aumentar los niveles de IL-1 en cerebro (Fontana y col, 1984; Quan y col, 1994), así como la síntesis de mRNA para IL-1 en hipocampo (Ban y col, 1992). Este aumento de la síntesis de IL-1, a su vez, sería el mediador que activaría el eje H-H-A (Rivier y col, 1989). En nuestro estudio la administración de LPS produjo en hipocampo un descenso significativo de la unión al receptor con IL-1 α . Descensos similares tras administrar LPS han sido descritos en riñón (Takao y col, 1991) y recientemente en hipocampo de ratón (Haour y col, 1990; Takao y col, 1994). Los estudios de saturación demostraron que dicho descenso en la unión al receptor era debido a una disminución del número de receptores disponibles no variando la K_d , de forma distinta a lo que Takao y col (1991) describieron para el riñón, donde el descenso de la unión al receptor se debía a cambios tanto en el B_{max} , como en la K_d .

Estos datos sugieren que la administración de LPS favorecería la liberación de IL-1 periférica y que ésta, bien penetrando en el SNC a través de los órganos circunventriculares o induciendo su síntesis en el propio SNC, sería capaz de producir un aumento de la concentración de IL-1 dentro del hipocampo, que disminuiría la unión al receptor del ligando radioyodado.

La administración previa de DEX no modificó la modulación del receptor tras inyectar LPS. Por el contrario, la adrenalectomía (ADX) incrementa dicha modulación haciendo que la unión al receptor de IL-1 tras LPS sea significativamente menor en animales ADX que en animales control (Ban y col, 1993b). Este último hecho puede interpretarse como que en ausencia de GC el aumento de IL-1 inducido por LPS es mayor (Butler y col, 1989) y que esta mayor

liberación de IL-1 en los animales LPS+ADX causaría un mayor descenso de la unión al receptor de IL-1, que en los animales control (LPS). No parece probable que la causa de dicha potenciación de los efectos del LPS sea debida a efectos de la ADX sobre el IL-1R (disminuyendo su expresión, por ejemplo), pues nosotros no hemos observado cambios en los niveles de IL-1R, dos y siete días después de realizar una ADX.

Aunque la administración de GC previa y durante la administración de LPS no modificó el grado de modulación que el LPS ejerció sobre la unión al receptor de IL-1, sin embargo, sí cabe destacar que los animales que recibieron DEX+LPS tuvieron una sintomatología clínica subjetivamente mucho menos llamativa que aquellos que recibieron LPS únicamente. Es conocido que los GC disminuyen la síntesis de IL-1 en sangre periférica inducida por LPS (Munck y col, 1984). Por otro lado, la IL-1, junto con el TNF α , son los principales mediadores de la sintomatología en el shock séptico (Cannon y col, 1990; Dinarello, 1991b). Además los corticosteroides inhiben la transcripción y síntesis de IL-1 si son administrados antes de iniciarse la transcripción de la molécula de IL-1 (Knudsen y col, 1987). En nuestro caso los corticosteroides fueron administrados antes del LPS, por lo que es probable que la síntesis de IL-1 fuera menor en los animales tratados, que en los controles. La clara disminución de la sintomatología clínica en los ratones tratados con DEX antes y durante la administración de LPS, respecto a los animales que sólo recibieron LPS, pudo deberse a una menor síntesis periférica de IL-1, no fue mediada por el IL-1R en hipocampo. Es probable que la disminución que los GC producen sobre la liberación de IL-1 inducida por LPS en sangre periférica, no sea lo suficientemente significativa para que el IL-1R se desocupe en hipocampo. En un sistema que requiere, sin embargo, sólo la ocupación de muy pocos receptores para inducir una respuesta fisiológica (Dinarello, 1991a) es poco probable que una respuesta clínica tan llamativa fuese a estar mediada por IL-1R en el hipocampo, cuya ocupación

variaba sólo minimamente.

4.) MODULACION DEL RECEPTOR DE IL-1 EN HIPOCAMPO EN LA ENCEFALOMIELITIS INDUCIDA POR EL VIRUS DE THEILER

Los mecanismos defensivos generales frente a las infecciones virales incluyen la activación de sistemas tanto antígeno-dependientes, como antígeno-independientes. La principal célula responsable de eliminar las células infectadas por virus será el linfocito T (L-T) citotóxico CD8+. Estas células reconocerán a través de receptor de la célula T (TCR) péptidos virales asociados a moléculas de clase I del MHC por parte de la célula infectada. Cada péptido viral será reconocido por un $\alpha\beta$ TCR específico para dicho péptido. Una vez reconocida la célula infectada, el L-T provocará, bien la citolisis directa o, bien la apoptosis de la célula infectada (Doherty, 1993; Ramsay y col, 1993).

Varias citocinas forman también parte del sistema defensivo contra las infecciones virales. Así, por ejemplo, es conocido que la infección de monocitos humanos con virus coxsackie B3 induce la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Henke y col, 1992; Huber y col, 1994). Dentro del SNC la infección de ratones con virus Sindbis (SV), un virus RNA de la familia de los togavirus y del género de los alphavirus, produce un aumento en los niveles de mRNA de IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN-g, TNF- α , IL-4, IL-10 y TGF- β en cerebro a distintos tiempos (Wesselingh y col, 1994).

Como en otras infecciones virales, las citocinas juegan un papel importante en la encefalomiелitis por TMEV. Astrocitos de ratones SJL/J secretan IL-1 e IL-2 tras ser cultivados en presencia de TMEV (Rubio y Torres, 1991). Por el contrario, los astrocitos de ratones BALB/cByJ no muestran variaciones en cuanto al nivel de esta citocinas en respuesta al TMEV (Rubio y Torres, 1991). Estos mismos

autores, sin embargo, no detectaron niveles elevados de IFN- γ en cultivos de astrocitos de ratones SJL/J cultivados en presencia de TMEV. Este dato, sin embargo, no coincide con estudios "in vivo" con ratones infectados con TMEV, donde se detectó un incremento de los niveles de IFN- γ , que además se relacionaban con una mayor supervivencia de los animales (Kohanawa y col, 1993). Otras citocinas como la IL-6 aumentan sus niveles en los sobrenadantes de cultivos de astrocitos tras ser incubados en presencia de TMEV. Sin embargo, este incremento se observa tanto en astrocitos de cepas resistentes como en astrocitos de ratones SJL/J (Rubio y Sierra, 1993b). Por tanto tenemos determinadas citocinas que "in vitro" parecen determinar la susceptibilidad o resistencia de las células a ser infectadas (IL-1, IL-2) y otras citocinas que aumentan "inespecíficamente" en presencia de TMEV (IL-6), tanto en cultivos de astrocitos procedentes de cepas de ratones sensibles a padecer la enfermedad, como en cepas de ratones resistentes.

Existen muy pocos estudios "in vivo" de la relación de citocinas con la encefalomiелitis por TMEV. Se ha descrito que la infección de ratones sensibles con TMEV produce la liberación de interferon- γ (IFN- γ) en el SNC, desde el 5º día post-infección y asociado a la existencia de replicación viral. El uso de un anticuerpo monoclonal frente a IFN- γ administrado el día 1 post-infección aumentó significativamente la mortalidad de los animales frente al los controles (Kohanawa y col, 1993). Este efecto beneficioso del IFN- γ debe relacionarse con el conocido efecto antiviral de esta citocina.

Nosotros hemos estudiado los efectos de la infección por TMEV, sobre el receptor de IL-1 en hipocampo. Por los estudios en cultivos de astrocitos sabíamos que el TMEV induce la secreción de IL-1 "in vitro" (Rubio y Torres, 1991). Además es conocido que la IL-1 va a ser uno de los mediadores de la lesión sobre la mielina en la Esclerosis Múltiple (Hoffmann y col, 1986; Selmaj y

col, 1988), enfermedad de la que la encefalomielititis por TMEV es modelo. Para estudiar la modulación del IL-1R se eligieron diferentes días, de especial interés en el desarrollo de la enfermedad. En el día 4 post-infección no se han detectado en ningún momento la presencia del virus en el interior de las neuronas, que comienza a ser detectado a partir del día 6 (Dal Canto y Lipton, 1982; Roos y Casteel, 1992;), o por técnicas de PCR a partir del día 5 post-inoculación (Roos, comunicación personal). Los días 10 y 14 constituyen los momentos de máxima activación del sistema inmune dentro del SNC tras la infección (ver Lipton, 1975). Finalmente, el día 28 post-inoculación representa el final de la fase aguda de la enfermedad. Los días 50 y 100 post-inoculación recogerían distintos periodos de la fase crónica de la enfermedad donde predomina la desmielinización. El estudio cronológico de la unión al receptor de IL-1 en ratones SJL/J machos, que presentaban una unión al receptor significativamente mayor que las hembras, demostró variaciones significativas entre la unión al receptor de los ratones infectados y los controles. Dichas variaciones siguen un curso paralelo a la detección de fenómenos de citotoxicidad en las neuronas del SNC, así como la detección de antígenos virales en las células del SNC, que son detectadas a partir del día 5 post-infección, alcanzan un máximo hacia el día 13 y comienzan a declinar hacia el día 20 (Lipton, 1975; Dal Canto y Lipton, 1982). Igualmente las variaciones observadas son superponibles en su curso en el tiempo a la aparición de anticuerpos frente al TMEV, que comienzan a ser detectables en suero hacia el día 7 incrementando sus niveles en el primer mes y persistiendo posteriormente elevados (Friedman y Lorch, 1985). Este último hallazgo no permite diferenciar sin embargo la susceptibilidad a padecer la enfermedad, pues se ha detectado con un perfil superponible al de los ratones SJL/J en ratones resistentes (Clatch y col, 1986). Al contrario, la respuesta de hipersensibilidad tardía (DTH) si es significativamente diferente entre ratones SJL/J y los BALB/cCum, apareciándose respuestas proliferativas de las células T frente a TMEV inactivado por radiación ultravioleta significativamente aumentadas en los animales susceptibles frente a

los controles (Clatch y col, 1986).

En nuestro caso la disminución de la unión al receptor de IL-1 fue un fenómeno específico de la infección por TMEV, pues ratones BALB/cByJ inyectados con dosis similares a las que causan un descenso de dicha unión en los SJL/J, no produjeron cambios significativos en el IL-1R. Es posible, por tanto, que la infección i.c. por TMEV codifique la secreción de un factor (IL-1 posiblemente) que module el IL-1R en el hipocampo. Otros virus como el virus de la vacuna son capaces de inducir la síntesis de moléculas similares a un IL-1R soluble, capaces de unirse competitivamente a la IL-1 β (Spriggs y col, 1992; Alcamí y Smith, 1992). Es decir, no es un hecho inhabitual que la infección celular por un virus sea capaz de codificar la secreción de moléculas relacionadas con las citocinas. Muy recientemente se ha descrito que la infección por TMEV produce la secreción "in vivo" de otras citocinas como el IFN-g (Kohanawa y col, 1993).

También es posible que la infección por TMEV produjese una destrucción de las células que expresan dicho receptor. Esta segunda posibilidad es poco probable, sin embargo, pues hemos observado que el tratamiento con DEX a partir del 5º día post-infección revierte el descenso en la unión al receptor, lo que no sería viable si este descenso se hubiese producido por muerte celular.

Por otro lado, es también muy llamativo, la ausencia de variaciones en la unión al receptor de IL-1, en las fases tardías de la enfermedad, donde se está produciendo una desmielinización activa y el animal presenta una sintomatología muy llamativa. Cabe la posibilidad, que tanto en la encefalomielitis por TMEV, como quizá en la Esclerosis Múltiple (EM), una infección viral en la época juvenil que cursa asintóticamente, en individuos genéticamente predispuestos, pueda inducir liberación de citocinas mielintóxicas capaces de alterar antigénicamente

la mielina. Esta variación induciría una respuesta inmune tardía frente a determinados antígenos de la mielina, que serían los responsables de la desmielinización observada posteriormente en la edad adulta.

El estudio de la cinética del receptor de IL-1 demostró, que al contrario de lo que ocurría con la modulación por LPS, donde el descenso en la unión al receptor se producía fundamentalmente a costa de un descenso en el número de receptores, en el caso de la modulación del IL-1R por medio de la infección por TMEV se producía por la pérdida de la afinidad del IL-1R por su ligando. Esto abría otras posibilidades para interpretar dicho hallazgo. La pérdida de afinidad por un ligando puede ser debido a múltiples factores. Collado-Escobar y col (1990) han descrito en una línea celular de células leucémicas, que los efectos de la dexametasona sobre estas células en relación con el receptor para la N-ethylcarboxanmida-adenosina (NECA) son mediados por cambios en el pre-acoplamiento a la proteína G de dicho receptor, inducidos por la propia dexametasona. En nuestro modelo la infección por el TMEV podría estar modificando el pre-acoplamiento del IL-1R a la proteína G y modificando así su afinidad por el ligando y la dexametasona revertiría dicho fenómeno, de modo similar a lo que ocurre con el receptor para la NECA.

Es llamativo el diferente comportamiento del IL-1R, en aquellas situaciones en las que se induce su modulación por LPS y en las que se inyecta TMEV. En el caso del LPS parece claro, que el descenso en la unión al IL-1R está producido por un descenso en el número de IL-1R. En el caso de la inyección por TMEV, sin embargo, el receptor se comporta de una forma totalmente distinta, perdiendo por completo su afinidad por el ligando. Sin embargo, en ambos casos se ha producido una activación para la síntesis y secreción endógena de IL-1. Por otro lado, si analizamos el efecto que la dexametasona produce sobre dicha modulación inducida en el primer caso por LPS, y en el segundo por TMEV,

observaremos respuestas opuestas. Tras administrar LPS la disminución en la unión al IL-1R no es reversible por dexametasona, mientras que en el caso de la inyección por TMEV, sí lo es. Estos comportamientos tan dispares ante situaciones que inducen la liberación de un mismo ligando se dan cuando se activan diferentes subtipos de un mismo receptor. Es posible por tanto, que el subtipo de IL-1R que está mediando la respuesta a la inyección periférica de LPS, sea distinto al IL-1R que media la respuesta a la inyección i.c. de TMEV. De hecho, podría plantearse la hipótesis de que la respuesta a la inyección de LPS afecte principalmente a receptores localizados en astrocitos, que están mejor caracterizados (Ban y col; 1993), mientras que la respuesta a la inyección por TMEV esté mediada por receptores para IL-1 en neuronas cuya caracterización es en la actualidad prácticamente desconocida.

Finalmente cabe también la posibilidad que el mecanismo de modulación del IL-1R, que se produce por la IL-1 de origen periférico, inducida por la inyección periférica de LPS, sea diferente a la modulación del IL-1R inducida por la secreción de IL-1 de origen central, que se produciría en la encefalomiелitis por TMEV. Así, la IL-1 podría estar activando dos tipos de receptores distintos dentro del SNC, uno de alta afinidad y otro de afinidad menor. La IL-1 periférica secretada en grandes cantidades durante los procesos infecciosos podría activar al receptor de alta y al de baja afinidad produciendo determinadas respuestas. Por el contrario, a bajas concentraciones, sólo se activaría el receptor de alta afinidad produciéndose otro tipo de respuestas. La expresión diferenciada de ambos receptores en células distintas (neuronas o glía, por ejemplo) podría explicar las diferencias observadas en cuanto a los efectos de la IL-1. Sin embargo, todas estas posibilidades no dejan de ser hipótesis y estudios posteriores deberán confirmar o refutar la validez de las mismas.

6.- CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo permite establecer las siguientes conclusiones:

1.- Hemos identificado y caracterizado sitios de unión de alta afinidad para interleucina-1 en el hipocampo de ratón. De los ligandos utilizados, la interleucina-1 recombinante humana presentó la mayor afinidad por dicho receptor. No existió diferencia en el grado de unión específica al receptor de interleucina-1 en las distintas cepas de ratón estudiadas.

2.- La administración aguda de glucocorticoides (dexametasona y corticosterona) no modificó la capacidad de unión de la interleucina-1 a su receptor. Con un esquema de administración subcrónica, la dexametasona indujo un pequeño descenso en la unión de la interleucina-1 a su receptor. Esta reducción no fue lo suficientemente importante como para reflejarse en los estudios de saturación. Los efectos de la corticosterona fueron siempre menos marcados. El tratamiento crónico con glucocorticoides condujo a resultados similares a los obtenidos con el tratamiento subcrónico.

3.- La aplicación de diferentes tipos de estrés subcrónico (estimulación acústica, exposición al frío y choque eléctrico inescapable) no modificó los niveles de unión de la interleucina-1 a su receptor.

4.- La disminución de los niveles de glucocorticoides a través de técnicas de manipulación neonatal (*handling*) y la ausencia total de los mismos mediante adrenalectomía son igualmente inefectivas en modificar los receptores centrales de interleucina-1.

5.- La activación del sistema inmune periférico mediante la administración sistémica de lipopolisacáridos bacterianos produjo un descenso muy significativo en el número de receptores de interleucina-1 en el hipocampo del ratón. La administración de dexametasona no tuvo influencia sobre la modulación observada tras la administración de lipopolisacáridos.

6.- La inoculación intracerebral del virus de Theiler en ratones susceptibles de la cepa SJL/J indujo descensos en la unión de la interleucina-1 a su receptor en hipocampo. Las variaciones observadas fueron dependientes del periodo de tiempo post-infección, coincidiendo con el perfil de activación del sistema inmune.

7.- Tras la inoculación con el virus de Theiler, los estudios de saturación realizados en el periodo de máxima reducción en la capacidad de unión de la interleucina-1 a su receptor, mostraron cambios muy significativos en la afinidad del receptor por su ligando. Estos cambios fueron específicos para las cepas sensibles a la infección por TMEV y se previnieron mediante la administración de dexametasona a partir del quinto día post-infección.

7.- BIBLIOGRAFIA

7.- BIBLIOGRAFIA

Addison T. (1855). *On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules*. Highley, London.

Akahoshi T., Oppenheim J.J., Matsushima K. (1988). Induction of high-affinity interleukin-1 receptor on human peripheral blood lymphocytes by glucocorticoid hormones. *J Exp Med*. 167:924-936.

Alcami A., Smith G.L. (1992). A soluble receptor for interleukin-1 β encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell*. 71:153-167.

Andreis P.G., Neri G., Belloni A.S., Mazzocchi G., Kasprzac A., Nussdorfer G.G. (1991). Interleukin-1 β enhances corticosterone secretion by acting directly on the rat adrenal gland. *Endocrinology*. 129:53-57.

Artz E., Sauer J., Pollmacher T., Labeur M., Holsboer F., Reul J.M.H.M., Stalla G.K. (1994). Glucocorticoids suppress interleukin-1 receptor antagonist synthesis following induction by endotoxin. *Endocrinology*. 134:672-676.

Atkins E. (1960). Pathogenesis of fever. *Physiol Rev*. 40:580-617.

Auron P.E., Webb A.C., Rosenwasser L.J., Mucci S.F., Rich A., Wolff S.M., Dinarello C.A. (1984) Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81:7907-7911.

Ban E., Milon G., Prudhomme N., Fillion G., Haour F. (1991). receptors for interleukin-1 (α and β) in mouse brain: mapping and neuronal localization in hippocampus. *Neuroscience*. 43:21-30.

Ban E., Haour F., Lenstra R. (1992). Brain interleukin 1 gene expression induced by peripheral lipopolysaccharide administration. *Cytokine*. 4:48-54.

Ban E., Sarlieve L.L., Haour F.G. (1993a). Interleukin binding sites on astrocytes. *Neuroscience*. 3:725-733.

- Ban E., Marquette C., Sarrieau A., Fitzpatrick F., Fillion G., Milon G., Rostene W., Haour F. (1993b). Regulation of interleukin-1 receptor expression in mouse brain and pituitary by lipopolysaccharide and glucocorticoids. *Neuroendocrinology*, 58:581-587.
- Bandtlow, C.E., Meyer M., Lindholm D., Spranger M., Heumann, R., Thoenen H. (1990). Regional and cellular codistribution of interleukin-1 β and nerve growth factor mRNA in the adult rat brain: possible regulation of nerve growth factor synthesis. *J Cell Biol.* 111:1701-1711.
- Banks W.A., Ortiz L., Plotkin S.R., Kastin A.J. (1991). Human interleukin-1 α , murine IL-1 α and murine IL-1 β are transported from blood to brain by a shared saturable mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 259:988-996.
- Barnes P.J., Adcock I. (1993). Antiinflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 14:436-441.
- Bergsteinsdottir K., Kingston A., Mirski R., Jessen K.R. (1991). Rat Schwann cells produce interleukin-1. *J Neuroimmunol.* 34:15-23.
- Berkenbosch F., Van Oers J., Del Rey A., Tilders F., Besedovski H. (1987). Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science*, 238:524-526.
- Berkenbosch F., de Rijk R., Schotanus D., Wolwers D., van Dam A.M. (1992). The immune-hypothalamo-pituitary adrenal axis: Its role in immunoregulation and tolerance to self-antigens. En: *Interleukin-1 in the brain*. Rothwell N.J., Dantzer R.D. (Eds.). Pergamon Press. Oxford. 75-91.
- Bernard C. (1859). *Leçons sur les propriétés physiologiques et les alterations pathologiques des liquides de l'organisme*. Balliere, Paris.
- Bernton E.W., Meltzer M.S., Holaday J.W. (1988). Suppression of macrophage activation and T-lymphocyte function in hypoprolactinemic mice. *Science* 239:401-404.

- Besedovski H.O., Sorkin E. (1977). Network of immune–neuroendocrine interactions. *Clinical Exp Immunol* 27:1–12.
- Besedovski H.O., del Rey A., Sorkin E. (1981). Lymphokine–containing supernatants from Con–A stimulated cells increase corticosterone blood levels. *J Immunol* 126:385–387.
- Besedovski H.O., del Rey A., Sorkin E. (1983). What do the immune system and the brain know about each other? *Immunol Today*, 4:342–346.
- Besedovski H.O., del Rey A., Sorkin E., Dinarello C.A. (1986). Immunoregulatory feed–back between interleukin–1 and glucocorticoid hormones. *Science*. 233:652–654.
- Bird T.S., Saklatvala J. (1986). Identification of a common class high affinity receptors for both types of porcine interleukin 1 on connective tissue cells. *Nature*. 324:263–266.
- Bird T.S., Gearing A.J.H., Saklatvala J. (1988). murine interleukin–1 receptor: direct identification by ligand blotting and purification to homogeneity of an interleukin–1 binding glycoprotein. *J Biol Chem*, 263:12063–12075.
- Blatteis C.M. (1992). The pyrogenic action of cytokines. En: Interleukin–1 in the brain (Rothwell N.J., Dantzer R.D., Eds.) *Pergamon Press. Oxford*. 93–113.
- Bomsztyk K., Sims J.E., Stanton T.H., Slack J., MacMahan C.J., Valentine M.A., Dower S.K. (1989). Evidence for different interleukin 1 receptors in murine B– and T–cell lines. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 86:8034–8038.
- Borrell J., Torrellas C., Guaza C., Borrell S. (1980). Sound stimulation and its effects on the pituitary–adrenocortical function and brain catecholamines in rats. *Neuroendocrinology* 31:53–59.
- Brahic M., Stroop W.G., Baringe J.R. (1981). Theiler's virus persists in glial cells during demyelinating disease. *Cell*. 26:123–126.

Breder C.D., Dinarello C.A., Saper C.B. (1988). Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science*. 240:321-324.

Butler L.D., Layman N.K., Riedl P.E., Cain R.L., Shellhaas J., Evans G.F., Zuckerman S.H. (1989). Neuroendocrine regulation of in vivo cytokine production and effects: I. In vivo regulatory networks involving the neuroendocrine system. *J Neuroimmunol*. 24:143-153.

Cambronero J.C., Borrell J., Guaza C. (1989). Glucocorticoids modulate rat hypothalamic corticotropin-releasing-factor release induced by interleukin-1. *J Neurosci Res*. 24:470-476.

Cambronero J.C., Rivas F.J., Borrell J., Guaza C. (1992a). Interleukin-1 induces pituitary adrenocorticotropin secretion: Evidence for glucocorticoid modulation. *Neuroendocrinology*. 55:648-654.

Cambronero J.C., Rivas F.J., Borrell J., Guaza C. (1992b). Role of arachidonic acid metabolism on corticotropin-releasing factor (CRF)-release induced by interleukin-1 from superfused rat hypothalami. *J Neuroimmunol*. 39:57-66.

Cannon W.B., de La Paz D. (1911). Emotional stimulation of adrenal secretion. *Am J Physiol* 27:64-70.

Cannon J.G., Tompkins R.G., Gelfand J.A., Michie H.R., Stanford G.G., van der Meer J.W.M., Endres S., Lonnemann G., Corsetti J., Chernow B., Wilmore D.W., Wolff S.M., Burke J.F., Dinarello C.A. (1990). Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis*. 161:79-84.

Chelmicka-Scorr E., Arnason B.G.W. (1990). Nervous system-Immune system interactions. En: *Immunologic Mechanisms in Neurologic and Psychiatric Disease* (Waksman B.H., Ed.). Raven Press, New York, 67-90.

Chen Y.Z., Fu H., Guo Z. (1993). Membrane Receptor for glucocorticoids in mammalian neurons. *Methods in Neurosciences*. 11:16-41.

Chizzonite R., Truitt T., Kilian P.L., Stern A.S., Nunes P., Parker K.P., Kaffka K.L., Chua A.O., Lugg D.K., Gubler U. (1989). Two high affinity interleukin-1 receptors represent separate gene products. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:8029-8033.

Chrousos G.P.; Gold P.W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioural homeostasis. *JAMA* 267:1244-1252

Clatch R.J., Lipton H.L., Miller S.D. (1986). Characterization of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-specific delayed type hypersensitivity responses in TMEV-induced demyelinating disease: correlation with clinical signs. *J Immunol*. 136:920-927.

Clatch R.J., Lipton H.L., Miller S.D. (1987). Class II- restricted T cell responses in Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced demyelinating disease. *Microb Pathol*. 3:327-337.

Collado-Escobar D., Ali H., Beaven M.A. (1990). On the mechanism of action of dexamethasone in a rat mast cell line (RBL-2H3 cells). Evidence for altered coupling of receptors and G-proteins. *J Immunol*. 144:3449-3457.

Colotta F., Re F., Muzio M., Bertini R., Polentarutti N., Sironi M., Giri J.G., Dower S.K., Sims J.E., Mantovani A. (1993). Interleukin type II Receptor: A decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261:472-475.

Cook S.D., Dowling P.C. (1980). Multiple sclerosis and viruses: an overview. *Neurology*. 41:335-343.

Cunningham Jr. E.T., Wada E, Carter D.B., Tracey D.E., Battey J.F., de Souza E.B. (1991). Localization of interleukin-1 receptor messenger RNA in murine hippocampus. *Endocrinology*. 128:2666-2668.

Cunningham Jr. E.T., Wada E, Carter D.B., Tracey D.E., Battey J.F., de Souza E.B. (1992). In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger mRNA in the central nervous system, pituitary and adrenal gland of the mouse. *J Neurosci*. 12:1101-1114.

- Cunningham Jr. E.T., de Souza E.B. (1993a). Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunol Today*. 14:171-176.
- Cunningham Jr. E.T., Wada E, Carter D.B., Tracey D.E., Battey J.F., de Souza E.B. (1993b). *In situ* histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary and adrenal gland of the mouse. *J Neurosci*. 12:1101-1114.
- Dal Canto M., Lipton H.L. (1982). Ultrastructural immunohistochemical localization of virus in acute and chronic demyelinating Theiler's virus infection. *Am J Pathol*. 106:20-29.
- Dallman M., Levin N., Cascio C., Akana S., Jakobson L., Kuhn R. (1989) Pharmacological evidence that inhibition of diurnal adrenocorticotropin secretion by corticosteroids is mediated via Type I corticosterone preferring receptors. *Endocrinology*. 124:2844-2853.
- Daniels J.B., Pappenheimer A.M., Richardson S. (1952). Observation on encephalomyelitis of mice (DA strain). *J Exp Med*. 96:517-530.
- Deyerle K.L., Sims J.E., Dower S.K., Bothwell M.A. (1992). Pattern of IL-1 receptor gene expression suggests role in noninflammatory processes. *J Immunol* 149:1657-1665.
- Dinarello C.A. (1991a). Interleukin-1 and Interleukin-1 antagonism. *Blood*. 77:1627-1652.
- Dinarello C.A., Cannon J.G., Wolff S.M. (1988). New concepts on the pathogenesis of fever. *Rev Infect Dis*. 10:168-209.
- Dinarello C.A. (1991b). The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of septic shock syndrome. *J Infect Dis*. 163:1177-1184.
- Doherty P.C. (1993). Inflammation in virus infections. *Seminars Virol*. 4:117-122.

Dower S.K., Kronheim S.R., March C.P., Conlon P.J., Hopp T.P., Gillis S., Urdal D.L. (1985). Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors from human interleukin-1. *J Exp Med.* 162:501-515.

Dower S.K., Kronheim S.R., Hopp T.P., Cantrell M., Deeley M. Gillis S., Henney C.S., Urdal D.L. (1986). The cell surface receptors for interleukin-1 α and interleukin-1 β are identical. *Nature.* 324:266-268.

Dower S.K., Bomzstyk K., Sims J.E. (1990). Structure of IL-1 receptors. *Prog Clin Biol Res.* 349:241-249.

Ehrlich G.D., Glaser J.B., Bryz-Gormia V., Mease J., Waldmann T.A., Poiesz B.J., Greenberg S.J. (1991). Multiple sclerosis retrovirus and PCR. The HTLV-MS working group. *Neurology.* 41:335-343.

Eisenberg S.P., Brewer M.T., Verderber E., Heimdal P., Brandhauber B.J., Thomson R.C. (1991). Interleukin-1 receptor antagonist is a member of the interleukin-1 gene family: evolution of a cytokine control mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:5232-5236.

Ericsson A., Kovacs K.J., Sawchenko P.E. (1994). A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci.* 14:897-913.

Farrar W.L., Kilian P.L., Ruff M.R., Hill J.M., Pert C.B. (1987). Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. *J Immunol.* 139:459-463.

Felten S.Y., Felten D.L. (1991). Innervation of the lymphoid tissue. En: *Psychoneuroimmunology 2^a edición* (Ader R., Felten D.L., Cohen N., Eds.) Academic Press, San Diego, 27-69.

Fontana A., Weber E., Dayer J.M. (1984). Synthesis of interleukin 1/endogenous pyrogen in the brain of endotoxin-treated mice: A step in fever induction? *J Immunol.* 133:1696-1698.

Friedmann A., Lorch Y. (1985). Theiler's virus infection: a model for Multiple Sclerosis. *Prog Med Virol.* 31:43-83.

Gallis B., Prickett K.S., Jackson J., Slack J., Schooley K., Sims J.E., Dower S.K. (1989). IL-1 induces rapid phosphorylation of the IL-1 receptor. *J Immunol.* 143:3235–3240.

Lowenthal J.W., MacDonald H.R. (1986). Binding and internalization of interleukin-1 by T cells: Direct evidence for high and low affinity classes of interleukin-1 receptor. *J Exp Med.* 164:1060–1077.

Gottschall P.E., Komaki G., Arimura A. (1992). Interleukin-1 β activation of the central nervous system. En: *Interleukin-1 in the brain*. Rothwell N.J., Dantzer R.D. (Eds.). Pergamon Press. Oxford 27–49.

Gray P.W., Glaister D., Chen E., Goeddel D.W., Pennica D. (1986). Two interleukin-1 genes in the mouse: cloning and expression of the cDNA for murine interleukin-1 β . *J Immunol.* 137:3644–3648.

Gould E., Wooley C.S., McEwen B.S. (1990). Short-term glucocorticoid manipulations affect neuronal morphology and survival in the adult dentate gyrus. *Neuroscience.* 37:367–375.

Guilian D., Lachman L.B. (1985). Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science.* 228:497–500.

Guilian D., Baker T.J., Shin L.N., Lachman L.B. (1986). Interleukin-1 of the central nervous system is produced by amoeboid microglia. *J Exp Med.* (1986). 164:594–604.

Gustafsson J., Carlstedt-Duke J., Poellinger L., Okret S., Wikstrom A., Bronnegard M., Gillner M., Dong Y., Fuxe K., Cintra A., Harstrand A., Agnati M. (1987). Biochemistry, molecular biology and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocrin Rev.* 8:185–239.

Haour F.G., Ban E.M., Milon G.M., Baran D., Fillion G.M. (1990). Brain interleukin 1 Receptors: Characterization and modulation after lipopolysaccharide injection. *Prog Neuroendocrin Immunol.* 3:196–204.

Hauser S.L., Doolittle T.H., Lincoln R., Brown R.H., Dinarello C.A. (1990). Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor, but not interleukin-6. *Neurology*. 40:1735-1739.

Hellerstein M.K., Meydani S.N., Meydani M., Wu K., Dinarello C.A. (1989). Interleukin-1-induced anorexia in the rat. Influence of prostaglandins. *J Clin Invest* 84:228-239.

Henke A., Mohr C., Sprenger H., Graebner C., Stelzner A., Nain M., Gemsa D. (1992). Coxsackievirus B-induced production of tumor necrosis factor- α , IL-1 β , and IL-6 in human monocytes. *J Immunol*. 148:2270-2277.

Higgins G.A., Olschowka J.A. (1991). Induction of interleukin-1 β in adult rat brain. *Mol Brain Res*. 9:143-148.

Hoffmann F.M., van Hanwehr R.I., Dinarello C.A., Mizel S.B., Merrill J.B. (1986). Immunoregulatory molecules and IL-2 receptors identified in multiple sclerosis brain. *J Immunol*. 136:3239-3245.

Huber S.A., Polgar J., Schultheiss P., Schwimbeck P. (1994). Augmentation of pathogenesis of Coxsackievirus B3 infections in mice by exogenous administration of interleukin-1 and interleukin-2. *J Virol*. 68:195-206.

Jobling S.A., Auron P.E., Gurka G., Webb A.C., MacDonald B., Rosenwasser L.J., Gehrke L. (1988). Biological activity and receptor binding of human prointerleukin-1 β and subpeptides. *J Biol Chem* 263:16372-16384.

Katsuki H., Nakai S., Hirai Y., Akaji K., Kiso Y., Satoh M. (1990). Interleukin-1 β inhibits long term potentiation in the CA3 region of the mouse hippocampal slices. *Eur J Pharmacol*. 181:323-326.

Katsuura G., Gottschall P.E., Arimura A. (1988a). Identification of a high affinity receptor for interleukin-1 β in rat brain. *Biochem Biophys Res Comm*. 156:61-67.

- Katsuura G., Gottschall P.E., Dahl R.R., Arimura A. (1988b). Adrenocorticotropin release by intracerebroventricular injection of recombinant human interleukin-1 in rats: possible involvement of prostaglandin. *Endocrinology*. 122:1773-1779.
- Katsuura G., Arimura A., Kovacs K., Gottschall P.E. (1990). Involvement of organum vasculosum lamina terminalis and preoptic area in interleukin1 beta-induced ACTH release. *Am J Physiol*. 258:E163-E171.
- Kern J.A., Lamb R.J., Reed, J.C., Daniele R.P., Nowell P.C. (1988). Dexamethasone inhibition of interleukin-1 β production by human monocytes: Posttranscriptional mechanisms. *J Clin Invest*, 81:237-244.
- Kilpatrick D.R., Lipton H.L. (1991) Predominant binding of Theiler's viruses to a 34-kilodalton receptor protein on susceptible cell lines. *J Virol*. 65:5244-5249.
- Kluger M.J. (1990). Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev*. 71:93-127.
- Knudsen P.J., Dinarello C.A., Strom T.B. (1987). Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. *J Immunol*. 139:4129-4134.
- Kohanawa M., Nakane A., Minagawa T. (1993). Endogenous gamma interferon produced in central nervous system by systemic infection with Theiler's virus in mice. *J Neuroimmunol*. 48:205-212.
- Kunicka J.E., Talle M.A., Denhard G.H., Brown M., Prince L.A., Goldstein G. (1993). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. *Cell Immunol* 149:39-49.
- Lechan R.M., Toni R., Clark B.D., Cannon J.G., Shaw A.R., Dinarello C.A. Reichlin S. (1990). Immunoreactive 1 β localization in the rat forebrain. *Brain Res*. 514:135-140.
- Lehrlich J.R., Arnason B.G.W., Hochberg F.H. (1976). Demyelinative myelopathy in mice induced by DA virus. *J Neurol Sci*. 29:149-160.

- Lipton H.L. (1975). Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. *Infection and Immunity*. 11:1147–1155.
- Liu C., Collins J., Sharp E. (1967). The pathogenesis of Theiler's GDVII encephalomyelitis virus infection in mice as studied by immunofluorescent and infectivity titrations. *J Immunol*. 98:46–55.
- Lledó A. (1994). Inmunología de la Esclerosis Múltiple. En: *Interferón β en esclerosis múltiple*. Martínez-Martín P (Ed.) Arké. Madrid. 45–70.
- Lomedico P.T., Gubler R., Hellmann C.P., Dukovich M., Giri J.G., Pan Y.E., Collier K., Semionow R., Chua A.O., Mizel S.B. (1984). Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*. *Nature*. 312:458–462.
- Luheshi G., Hopkins S.J., Lefevre R.A., Dascombe M.J., Ghiara P., Rothwell N.J. (1993). Importance of brain IL-1 type II receptors in fever and thermogenesis in the rat. *Am J Physiol*. 265:E585–E591.
- March C.J., Mosley B., Larsen A., Cerretti D.P., Braedt G., Price V., Gillis S., Henney C.S., Krohnheim S.R., Grabstein S.R., Conlon P.J., Hopp T.P. Cosman D. (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature*. 315:641–647.
- Martyn C. (1991). The epidemiology of multiple sclerosis. In: *McAlpine's Multiple sclerosis*. Matthews W.B. (Eds). Churchill Livingstone. Edinburgh. 3–40.
- McEwen B.S., de Kloet E.R., Rostene W. (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev*. 66:1121–1188.
- Meaney M.J., Aitken D.H., van Berkel C., Bhatnagar S., Sapolsky R.M. (1988). Effect of neonatal handling on age related impairments associated with the hippocampus. *Science*. 239:766–768.
- Meaney M.J., Aitken D.H., Viau V., Sharma S., Sarrieau A. (1989). Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology*. 50:597–604.

- Melvold R.W., Jokinen D.M., Knobler R.L., Lipton H.L. (1987). Variations in genetic control of susceptibility to Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced demyelinating disease. I. Differences between susceptible SJL/J and resistant BALB/c strains map near the T cell β -chain constant gene on chromosome 6. *J Immunol.* 138:1429-1433.
- Minami M., Kuraishi Y., Yamaguchi T., Nakai S., Hirai Y., Satoh M. (1991). Immobilization stress induces interleukin-1 β mRNA in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett.* 123:254-256.
- Mizel S.B., Kilian P.L., Lewis J.C., Pagenelli K.A., Chizzonite R.A. (1987). The interleukin 1 receptor. Dynamics of interleukin 1 binding and internalization in T cells and fibroblasts. *J Immunol.* 138:2906-2912.
- Munck A., Guyer P.M., Holbrook N.Y. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their pharmacological actions. *Endocrine Rev.* 5:25-44.
- Nagy E., Berczi, I. (1978). Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol* 89: 530-537.
- Natan C. (1987). Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* 79:319-326.
- Nicholson S.M., Peterson J.D., Miller S.D., Wang K., Dal Canto M.C. Melvold R.V. (1994). BALB/c substrain differences in susceptibility to Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *J Neuroimmunol.* 52:19-24.
- Nieto-Sampedro M., Berman M.A. (1987). Interleukin-1 activity in rat brain: sources, targets, and the effect of injury. *J Neurosci Res.* 17:214-219.
- Obal F., Opp M., Cady A.B., Johannsen L, Postlethwaite A.E., Poppleton H.M., Seyer J.M., Krueger J.M. (1990). Interleukin- α and interleukin- β fragment are somnogenic. *Am J Physiol* 259:R439-R446.
- Olitsky P.K. (1940). A transmissible agent (Theiler's virus) in intestines of normal mice. *J Exp Med.* 72:113-127.

Opp M.R., Obal F., Krueger J.M. (1991). Interleukin 1 alters rat sleep : temporal and dose related effects. *Am J Physiol.* 260:R52–R58.

Plata–Salaman, C.R., Oomura Y., Kai,Y. (1988). Tumor necrosis factor and interleukin-1 β : supression of food intake by a direct action on the central nervous system. *Brain Res.* 488:106–114.

Orchinik M., Murray T.F., Moore F.L. (1991). A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science.* 252:1848–1851.

Quan N., Sundar S.K., Weiss J.M. (1994). Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol.* 49:125–134.

Ragheb S., Lisak R.P. (1993). Multiple sclerosis: Genetic background vs enviroment. *Ann Neurol.* 34:80–91.

Ramsay A.J.,Ruby J., Ramshaw I.A. (1993). A case for cytokines as effector molecules in the resolution of virus infection. *Immunol Today.* 14:155–157.

Reder A.T., Arnason B.G.W. (1985) Immunology of multiple sclerosis. En: *Handbook of Clinical Neurology (Vol.3). Demyelinating Diseases.* Elsevier. New York. 337–395.

Reul J., DeKloet R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 117:2505–2511.

Rivier C., Plotski P.M. (1986) Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophyseal hormone secretion. *Annu Rev Physiol.* 48:475–494.

Rivier C., Vale W., Brown M. (1989). In the rat, interleukin-1 α and - β stimulate adrenocorticotropin and catecholamine release. *Endocrinology.* 125:3096–3102.

Rivier C., Vale W. (1990). Cytokines act within the brain to inhibit luteinizing hormone secretion and ovulation in the rat. *Endocrinology.* 127:849–856.

- Rodriguez M., Leibowitz J.L., Lampert P.W. (1983). Persistent infection of oligodendrocytes in Theiler's virus-induced encephalomyelitis. *Ann Neurol.* 13:426-433.
- Rodriguez M., Dunkel A.J., Thiemann R.L., Leibowitz J.L., Zijlstra M., Jaenisch R. (1993). Abrogation of resistance to Theiler's virus-induced demyelination in H-2b mice deficient in $\beta 2$ -microglobulin. *J Immunol.* 151:266-276.
- Roh M.S., Drazenovich K.A., Barbose J.J., Dinarello C.A., Cobb C.F. (1987). Direct stimulation of adrenal cortex by interleukin-1. *Surgery.* 102:140-146.
- Roos R.P., Casteel N. (1992). determinants of neurological Disease Induced by Theiler's murine encephalomyelitis virus. En: *Molecular Neurovirology.* Roos R.P. (Ed.). Humana Press, Totowa, NJ. 283-318.
- Rosenwasser L.J., Webb A.C., Clark B.D., Irie S., Chang L., Dinarello C.A., Gehrke L., Wolff S.M., Rich A., Auron P.E. (1986). Expression of biological active human interleukin-1 subpeptides by transfected simian COS cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:5243-5249.
- Rothwell N.J. (1991). Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *Trends Phamacol Sci.* 12:430-436.
- Rubio N., Torres C. (1991). IL-1, IL-2 and IFN-gamma production by Theiler's virus-induced encephalomyelitic SJL/J mice. *Immunology.* 74:284-289.
- Rubio N., Capa L. (1993a). Differential IL-1 synthesis by astrocytes from Theiler's murine encephalomyelitis virus-susceptible and -resistant strains of mice. *Cell Immunol.* 149:137-247.
- Rubio N., Sierra A. (1993b). Interleukin-6 production by brain tissue and cultured astrocytes infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Glia.* 9:41-47.
- Sandi C., Borrell J., Guaza C. (1992a) Behavioral factors in stress-induced immunomodulation. *Behav Brain Res.* 48:95-98.

Sandi C., Borrell J., Guaza C. (1992b). Behavioural, neuroendocrine, and immunological outcomes of escapable and inescapable shocks. *Physiol Behav.* 51:651–656.

Saperstein A., Brand H., Audhya T., Nabriski D., Hutchinson B., Rosenzweig S., Hollander C.S. (1992). Interleukin- 1β mediates stress induced immunosuppression via corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 130:152–158.

Saphier D. Electrophysiological studies of the effects of interleukin-1 and α -interferon on the EEG and pituitary-adrenocortical activity. En: *Interleukin-1 in the brain* (Rothwell N.J., Dantzer R.D., Eds.) Pergamon Press. Oxford. 51–73.

Sapolski R.M., Krey L.C., McEwen B.S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Neuroendocrinology.* 7:284–301.

Sapolski R., Rivier C., Yamamoto G., Plotski P., Vale W. (1987). Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* 238:522–524.

Sapolski R.M. (1992). The hippocampus as a mediator of glucocorticoid feedback regulation. En: *Stress, the aging brain and the mechanisms of neuronal death.* MIT Press, Cambridge, Massachusetts 71–94.

Scapigliati G., Ghiara P., Bartalini M., Tagliabue A., Boraschi D. (1989). Differential binding of IL- 1α and IL- 1β to receptors on B cells and T cells. *FEBS Lett.* 243:394–398.

Schumacher M. (1990). Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci.* 13:359–362.

Selmaj K., Nowak Z., Tchorzewski H. (1988). Multiple sclerosis: effect of myelin basic protein on interleukin-1, interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression in vitro. *Clin Exp Immunol.* 72:428–433.

Selye H. (1936). Thymus and adrenals in the response of the organisms to injuries and intoxications. *Br J Exp Pathol* 17:234–238.

Selye H (1976a). Stressors and conditioning agents. Physical agents: temperature variations. En: *Stress in health and disease*. Butterworths. Boston. 96–117.

Selye H (1976b). Stressors and conditioning agents. Sound. En: *Stress in health and disease*. Butterworths. Boston. 124–137.

Selye H (1976c). Stressors and conditioning agents. Electricity, electroshock. En: *Stress in health and disease*. Butterworths. Boston. 154–160.

Sims J.E., March C.J., Cosman D., Widner M.B., MacDonald H.R., McMahan C.J., Grubin C.E., Wignall J.M., Jackson J.J., Call S.M., Friend D., Alpert A.R., Gillis S., Urdal D.I., Dower S.K. (1988). cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science*. 241:585–589.

Sherrit M.A., Oksenberg J., Kerlero de Rosbo N., Bernard C.C.A. (1992). Influence of HLA DR2, HLA DPw4 and T-cell receptor chain genes on the susceptibility to MS. *Int Immunol*. 4:177–181.

Sloviter R.S., Valiquette G., Abrams G.M., Ronk E.C., Sollas A.L., Paul L.A., Neubort S. (1989). Selective loss of hippocampal granule cells in the mature rat brain after adrenalectomy. *Science*. 243:535–538.

Spranger M., Lindholm D., Brandtlow C.E., Heumann R., Thoenen H. (1990). Regulation of nerve growth factor synthesis in the rat central nervous system: comparison between the effects of interleukin-1 β and various growth factors in astrocytes cultures and in vivo. *Eur J Neurosci*. 2:69–76.

Spriggs M.K., Hruby D.E., Malizewski C.R., Pickup D.J., Sims J.E., Buller R.M.L., VanSlyke J. (1992). Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein. *Cell*. 71:145–152.

Sternberg E.M., Hill J.M., Chrousos G.P., Kamilaris T., Listwak S.J., Gold P.W., Wilder R.L. (1989a). Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats.

Proc Natl Acad Sci USA. 86:4771–4775.

Sternberg E.M., Young III W.S., Bernardini R., Calogero A.E., Chrousos G.P., Gold P.W., Wilder R.L. (1989b). A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall induced arthritis in Lewis rats. Proc Natl Acad Sci USA. 86:4771–4775.

Stosic-Grujicic S., Lukic M.L. (1992). Glucocorticoid -induced keratinocyte-derived interleukin-1 antagonist(s). Immunology. 75:293–298.

Stroop W.G., Baringer J.R. (1982). Persistent, slow and latent viral infections. Prog Med Virol. 28:1–43.

Takao T., Tracey D.E., Mitchell M., de Souza E.B. (1990). Interleukin-1 receptors in mouse brain: Characterization and neuronal localization. Endocrinology. 127:3070–3078.

Takao T., Mitchell M., de Souza E.B. (1991). Interleukin-1 receptors in mouse kidney: identification, localization, and modulation by lipopolysaccharide treatment. Endocrinology. 128:2618–2624.

Takao T., Newton R.C., de Souza E.B. (1993). Species differences in [¹²⁵I]interleukin-1 binding in the brain, endocrine and immune tissues. Brain Res. 623:172–176.

Takao T., Nakata H., Tojo C., Kurokawa H., Nishioka T., Hashimoto K., De Souza E.B. (1994). Regulation of interleukin-1 receptors and hypothalamic-pituitary-adrenal axis by lipopolysaccharide treatment in the mouse. Brain Res. 649:265–270.

Theiler M. (1937). Spontaneous encephalomyelitis of mice, a new virus disease. J Exp Med. 65:705–719.

Tominaga T., Fukata J., Naito Y., Usui T., Murakami N., Fukushima M., Nakai Y., Hirai Y., Imura H. (1991). Prostaglandin-dependent *in vitro* stimulation of adrenocortical steroidogenesis by interleukins. Endocrinology. 128:526–531.

Torrellas A., Guaza C., Borrell J. (1980). effects of acute and prolonged administration of chlordiazepoxide upon the pituitary-adrenal activity and brain catecholamines in sound stressed and unstressed rats. *Neuroscience*. 5:2289-2295.

Uehara A., Gottschall P.E. Dahl R.R., Arimura A. (1987). Interleukin 1 stimulates ACTH release by an indirect action which requires endogenous corticotropin-releasing factor. *Endocrinology*. 121:1580-1582.

Uehara A., Sekiya C., Takasugi Y., Namiki M., Arimura A. (1989). Anorexia induced by interleukin 1: involvement of corticotropin-releasing factor. *Am J Physiol* 257:R613-R617.

van Dam A.M., Brouns M., Louisse S., Berkenbosch F. (1992). Appearance of interleukin-1 in macrophages and in ramified microglia in the brain of endotoxin treated rats: a pathway for the induction of non-specific symptoms of sickness? *Brain Res*. 588:291-296.

Walker D.L. (1964). The viral carrier state in animal cell cultures. *Prog Med Virol*. 6:111-148.

Waksman B.H., Reingold S.C. (1986). Viral etiology of multiple sclerosis: where does the truth lie?. *Trends Neurosci*. 9:388-391.

Waksman B.H. (1989). Multiple sclerosis. relationship to a retrovirus? *Nature*. 337:599.

Walker D.L. (1964). The viral carrier state in animal cell cultures. *Progr Med Virol*. 6:111-148.

Watanobe H., Takebe K. (1993). Intrahypothalamic perfusion with interleukin-1 β stimulates the local release of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin and the plasma adrenocorticotropin in freely moving rats: a comparative perfusion of the paraventricular nucleus and the median eminence. *Neuroendocrinology*. 57:593-599.

Webb A.C., Collins K.L., Auron P.E., Eddy R.L., Nakai H., Byers M.G., Haley L.L., Henry W.M., Shows T.B. (1986). Interleukin-1 gene (IL-1) assigned to long arm of human chromosome 2. *Lymphokine Res.* 5:77-86.

Webster E.L., Tracey D.E., De Souza E.B. (1991). Upregulation of interleukin-1 receptors in mouse AtT-20 pituitary tumor following treatment with corticotropin-releasing factor. *Endocrinology.* 129:2796-2798.

Weidenfeld J., Abrahamski O, Ovadia H. (1989) Evidence for the involvement of the central adrenergic system in interleukin-1 induced adrenocortical response. *Neuropharmacology.* 28:1411-1419.

Wesselingh S.L., Levine B., Fox R.J., Choi S., Griffin D.E. (1994) Intracerebral cytokine mRNA expression during fatal and nonfatal alphavirus encephalitis suggests a predominant type 2 T cell response. *J Immunol.* 152:1289-1297.

Wingfield P., Payton M., Tavernier J., Barnes M., Shaww A., Rose K., Simona M.J., Demczuk S., Williamson K., Dayer J.M. (1986). Purification and characterization of human interleukin-1 ceta expressed in recombinant form. *Eur J Biochem* 150:491-501.

Whitcomb R.W., Linehan W.M., Wahl L.M., Knazack R.A. (1988). Monocytes stimulate cortisol production by cultured human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol.* 66:33-38.

Winter J.S., Gow K.W., Perry Y.S., Greenberg A.H. (1990). A stimulatory effect of interleukin-1 adrenocortical cortisol secretion mediated by prostaglandins. *Endocrinology.* 127:1904-1909.

Woloski B.M.R.N.J., Smith E.M, Meyer III W.J., Fuller G.M., Blalock J.E. (1985). Corticotropin releasing activity of monokines. *Science.* 230:1035-1037.