

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas



* 5 3 0 9 5 4 9 8 7 9 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Modulación de la respuesta inmune
por los neuropéptidos:
bombesina, GRP y neuromedina c

Tesis Doctoral

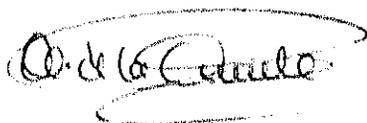
Mónica del Río Zaldúa

Madrid, 1994

Dña. MONICA DE LA FUENTE DEL REY, Catedrática de Biología Animal II (Fisiología Animal) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA: Que Dña. MONICA DEL RIO ZALDUA, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, el trabajo titulado: "Modulación de la respuesta Inmune por los neuropéptidos: bombesina, GRP y neuromedina C", que presenta a superior juicio del Tribunal que designa la Universidad Complutense de Madrid, para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, 1 de Junio de 1994,



VºBº del Director
Mónica de la Fuente del Rey



El Interesado
Mónica del Río Zaldúa

A Victor

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado de una u otra forma a realizar este proyecto.

En primer lugar a la Dra. Mónica de la Fuente que me ha brindado la oportunidad de dedicarme a la investigación y realizar mis aspiraciones, por su gran dedicación en la dirección de este trabajo.

A mis compañeros y compañeras de laboratorio por formar un grupo estupendo con el que he pasado muy buenos ratos dentro y fuera del mismo. A Dolores, con quien he compartido trabajo e inquietudes desde que entramos juntas en este mundo de la ciencia. A Manuel, a Montse, a Paco, a Nacho, a los que se fueron, y a los recién llegados: Idoia, Amparo, Marina, Sonia, Gemma y Jake.

A todas y cada una de las personas que forman el Depto de Fisiología Animal, por su colaboración y apoyo constante.

A Rosa M. P. Gomariz, a Elvira Garrido, a Javier Leceta, a Mario Delgado y a Carmen Martínez del Depto. de Biología Celular, que tanto me han ayudado.

A Lisardo Boscá, por su inestimable colaboración y sus valiosas sugerencias.

A Angel Hernanz, por dedicarme su tiempo frente al ordenador y por sus críticas constructivas.

Y muy especialmente a mi familia y a Víctor, que también es ya mi familia, sin ellos nada hubiera sido posible.

Gracias a todos.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado con ayudas del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (0045/89 y 0697/92) y del Plan Regional de Investigación de la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid (C239/91).

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
APC	Célula presentadora de antígeno
BN	Bombesina
CCK	Colecistoquinina
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
Con A	Concanavalina A
CRF	Factor liberador de corticotropina
DAB	Diaminobencidina
DMBA	Dimetilbenzantraceno
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELAM-1	Molécula de adhesión de leucocitos a endotelio
FFM	Factor de fusión de macrófagos
FMLP	Formil-Met-Leu-Phe o péptido formilado
FSH	Hormona estimuladora del folículo
GH	Hormona de crecimiento
GRF	Factor liberador de hormona del crecimiento
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFN	Interferon
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
LH	hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de hormona luteinizante
LPS	Lipopolisacárido
LTB4	Leucotrieno B4
MGC	Células gigantes multinucleadas
MIF	Factor Inhibidor de la migración

MLR	Cultivos mixtos de linfocitos
NK	Citotoxicidad natural "Natural killer"
NPY	Neuropéptido Y
PAF	Factor de activación plaquetar
PAP	Complejo peroxidasa antiperoxidasa
PHA	Fitoheماغلوتinina
PKC	Proteína quinasa C
PMA	Forbol miristato acetato
PMN	Leucocito polimorfonucleado
PRL	Prolactina
PTH	Hormona paratiroidea
SCLC	Carcinoma pulmonar "small cell lung cancer"
S.E.	Sistema Endocrino
S.I.	Sistema Inmune
S.N.	Sistema Nervioso
S.N.C.	Sistema nervioso central
SP	Sustancia P
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRF	Factor liberador de TSH
TSH	Hormona estimulante del tiroides
VIP	Péptido Intestinal vasoactivo

INDICE

Pág.

RESUMEN	1
1. INTRODUCCION.	2
1.1. El eje neuroendocrino-inmune.....	2
1.2. Agentes inmunes que afectan al sistema neuroendocrino.....	3
1.3. Inmunomodulación por el sistema nervioso y endocrino.....	5
1.3.1. Agentes nerviosos y endocrinos que regulan la actividad de las células inmunes.....	6
1.3.1.1. Neurotransmisores y hormonas.....	7
1.3.1.1.1. Eje hipotálamo-hipófisis.....	7
1.3.1.1.2. Hormonas adrenomodulares.....	8
1.3.1.1.3. Hormonas adrenocorticales.....	9
1.3.1.1.4. Hormonas sexuales.....	9
1.3.1.1.5. Otras hormonas y neurotransmisores.....	10
1.3.1.2. Neuropeptidos y hormonas gastrointestinales.....	11
1.3.1.3. Bombesina (BN) y péptidos relacionados.....	17
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y METODOS	26
3.1. Materiales.....	26
3.1.1. Material Biológico.....	26
3.1.2. Medios de cultivo.....	26
3.1.3. Sueros y anticuerpos.....	27
3.1.4. Mitógenos.....	27
3.1.5. Neuropeptidos.....	27
3.1.6. Otros péptidos.....	27
3.1.7. Reactivos químicos.....	27
3.1.8. Productos marcados con isótopos radiactivos.....	28
3.1.9. Kits comerciales.....	28
3.1.10. Material de laboratorio de especial interés.....	29
3.1.11. Aparataje.....	29
3.2. Métodos.....	30
3.2.1. Dilución de los neuropeptidos.....	30

3.2.2. Obtención de muestras celulares.....	30
3.2.2.1. Obtención de macrófagos peritoneales murinos.....	30
3.2.2.2. Obtención de leucocitos de órganos linfoides.....	31
3.2.3. Viabilidad celular.....	32
3.2.4. Estudio del proceso fagocítico.....	32
3.2.4.1. Adherencia a sustrato.....	33
3.2.4.2. Movilidad inducida (Quimiotaxis).....	33
3.2.4.3. Capacidad quimioatrayente.....	34
3.2.4.4. Fagocitosis de <i>Cándida albicans</i>	34
3.2.4.4.1. En tubo.....	34
3.2.4.4.2. En placa MIF.....	35
3.2.4.5. Fagocitosis de partículas inertes (bolas de latex).....	35
3.2.4.6. Digestión del material fagocitado.....	36
3.2.4.6.1. Test de reducción del Nitroazul de tetrazolio (NBT)	36
3.2.4.6.2. Estudio de la formación de metabolitos del oxígeno por citometría de flujo.....	37
3.2.5. Estudio de la función linfoide.....	37
3.2.5.1. Quimiotaxis y capacidad quimioatrayente.....	38
3.2.5.2. Respuesta proliferativa.....	38
3.2.6. Estudio de la actividad citotóxica.....	39
3.2.6.1. Ensayo de citotoxicidad por incorporación de ⁵¹ Cr.....	40
3.2.6.2. Ensayo de citotoxicidad por valoración enzimática.....	41
3.2.7. Estudio de la colaboración Inter celular.....	41
3.2.7.1. Efecto de los neuropéptidos sobre la producción de IL-1 por macrófagos.....	41
3.2.7.1.1. Obtención de sobrenadantes con IL-1.....	41
3.2.7.1.2. Valoración de los niveles de IL-1β.....	42
3.2.7.2. Efecto de los neuropéptidos sobre la producción de IL-2 por linfocitos.	42
3.2.7.2.1. Obtención de sobrenadantes con IL-2.....	42
3.2.7.2.2. Valoración de los niveles de IL-2.....	42
3.2.7.3. Valoración de la producción de FFM.....	43
3.2.8. Preincubaciones con los neuropéptidos.....	43

3.2.9. Estudio de la especificidad de los efectos.....	44
3.2.9.1. Estudios de competencia con un antagonista del receptor para la BN.....	44
3.2.9.2. Presencia de receptores para BN y GRP en células Immunocompetentes.	44
3.2.9.2.1. Determinación de receptores para BN en macrófagos y linfocitos.....	44
3.2.9.2.2. Determinación de receptores para GRP en macrófagos y linfocitos.....	45
3.2.10. Ensayo de quimiotaxis modificado para la determinación de la presencia de un factor secretado por macrófagos.....	45
3.2.11. Estudio del mecanismo de acción de los neuropéptidos....	46
3.2.11.1. Valoración de AMPc.	46
3.2.11.1.1. Procesamiento de las muestras celulares.....	46
3.2.11.1.2. Cuantificación de AMPc.....	46
3.2.11.2. Valoración de inositol trifosfato (IP ₃).	47
3.2.11.2.1. Procesamiento de las muestras celulares.....	47
3.2.11.2.2. Cuantificación de IP ₃	47
3.2.11.3. Ensayo de la actividad proteina quinasa C.....	48
3.2.11.3.1. Activación y purificación del enzima.	48
3.2.11.3.2. Ensayo enzimático.....	48
3.2.7. Estudio estadístico.....	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1. Efecto comparado de bombesina, GRP y neuromedina C sobre el proceso fagocítico de macrófagos peritoneales murinos.....	51
4.1.1. Adherencia a sustrato.....	51
4.1.2. Quimiotaxis.....	54
4.1.3. Capacidad quimioatrayente.....	54
4.1.4. Capacidad de ingestión.....	56
4.1.5. Poder de digestión.....	58

4.2. Efecto de bombesina, GRP y neuromedina C sobre la funcionalidad de linfocitos murinos.....	62
4.2.1. Quimiotaxis.....	62
4.2.2. Capacidad quimioatrayente.....	64
4.2.3. Proliferación.....	66
4.3. Efecto de bombesina, GRP y neuromedina C sobre la funcionalidad de las células citotóxicas.....	71
4.3.1. Actividad "natural killer" (NK).....	71
4.3.2. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.....	74
4.4. Estudios de colaboración intercelular.....	76
4.4.1. Producción de IL-1 β	76
4.4.2. Producción de IL-2.....	77
4.4.3. Producción de FFM.....	79
4.5. Efecto de los tres péptidos en incubaciones previas al ensayo.....	80
4.6. Estudio de la especificidad de los efectos de los neuropéptidos.....	81
4.6.1. Utilización del antagonista del receptor para la bombesina.	81
4.6.1.1. Efecto del antagonista en la capacidad quimioatrayente de los neuropéptidos.....	81
4.6.1.2. Efecto del antagonista en la actividad NK.....	83
4.6.2. Ensayos de unión al neuropéptido marcado.....	84
4.6.2.1. Unión a macrófagos peritoneales.....	84
4.6.2.2. Unión a linfocitos de ganglios axilares.....	86
4.7. Efecto de los péptidos en poblaciones celulares purificadas.....	87
4.7.1. Efecto comparado de los neuropéptidos sobre la función de macrófagos purificados del peritoneo y la suspensión peritoneal completa.....	87
4.7.1.1. En fagocitosis de latex.....	87
4.7.1.2. En la actividad citotóxica.....	88
4.7.2. Efecto comparado sobre muestras completas y purificadas de linfocitos.....	90
4.7.2.1. Quimiotaxis.....	90
4.7.2.2. Proliferación.....	93
4.7.2.3. Capacidad citotóxica.....	93

4.8. Producción de un factor por las células adherentes, responsable de los efectos de los neuropéptidos en la función linfoides.....	102
4.9. Mecanismos de acción intracelular de los tres neuropéptidos: BN, GRP y neuromedina C.....	104
4.9.1. Niveles de AMPc intracelular.....	104
4.9.1.1. En macrófagos.....	104
4.9.1.2. En linfocitos.....	105
4.9.2. Niveles de IP3.....	106
4.9.2.1. En macrófagos.....	106
4.9.2.2. En linfocitos.....	107
4.9.3. Actividad proteína quinasa C.....	108
4.9.3.1. Actividad PKC en leucocitos.....	108
4.9.3.2. Actividad PKC en macrófagos y en linfocitos purificados.....	109

5. DISCUSION 111

5.1. Efecto de los neuropéptidos de la familia de la bombesina sobre el proceso fagocítico de los macrófagos peritoneales murinos.....	114
5.1.1. Adherencia.....	115
5.1.2. Quimiotaxis.....	116
5.1.3. Fagocitosis.....	118
5.1.4. Digestión.....	120
5.2. Efecto sobre las funciones de linfocitos.....	121
5.2.1. Quimiotaxis.....	122
5.2.2. Proliferación.....	123
5.3. Efecto sobre la actividad NK y ADCC.....	125
5.4. Efecto sobre la secreción de factores de colaboración intercelular.....	127
5.5. Efecto de la preincubación con los neuropéptidos.....	129
5.6. Especificidad de los efectos observados.....	130
5.6.1. Utilización de un antagonista de la BN.....	130
5.6.2. Determinación de la presencia de receptores específicos en las células inmunes.....	131
5.7. Efecto de los neuropéptidos sobre poblaciones celulares purificadas.....	132
5.7.1. Efecto sobre poblaciones purificadas de macrófagos.....	132

5.7.2. Efecto sobre poblaciones purificadas de linfocitos.....	133
5.8. Existencia de un factor mediador en el efecto de los neuropéptidos sobre los linfocitos.....	134
5.9. Mecanismos de acción a nivel intracelular.....	135
5.9.1. Mecanismos intracelulares en macrófagos.....	136
5.9.2. Mecanismos intracelulares en linfocitos.....	137
6. CONCLUSIONES.....	140
7. BIBLIOGRAFIA.....	142

RESUMEN

RESUMEN

En el presente trabajo hemos demostrado que la bombesina y sus dos neuropéptidos relacionados en mamíferos, el péptido liberador de gastrina (GRP) y la neuromedina C, modulan positivamente la respuesta inmune *in vitro* en ratones de la cepa BALB/c. Los efectos son dosis dependientes, siendo la concentración de neuropéptido más efectiva la de 10^{-10} M. En concreto estimulan todas y cada una de las etapas del proceso fagocítico de macrófagos peritoneales: adherencia a sustrato, quimiotaxis, ingestión y digestión de partículas. Estimulan la quimiotaxis y la proliferación de linfocitos obtenidos de peritoneo y de ganglios axilares, bazo y timo, así como inhiben la proliferación en respuesta a mitógenos (Concanavalina A y LPS). Exhiben efectos estimuladores también sobre la capacidad citotóxica natural (NK) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) en células linfoides y en macrófagos peritoneales. Producen un aumento en los niveles de secreción de IL-1 β y una disminución en los niveles de producción de dicha Interleukina en respuesta a Con A, mientras que no se observa modificación en los niveles de IL-2. Estos efectos son específicos como lo demuestra el que se vean revertidos en presencia de un antagonista de la BN y la existencia de receptores de alta afinidad en macrófagos. La regulación de la funcionalidad del linfocito por estos neuropéptidos está mediada por células adherentes accesorias, en concreto macrófagos, como lo demuestra el hecho de que se requiera la presencia de algún o algunos factores solubles secretados por estas células en respuesta a la incubación con los neuropéptidos para observar sus efectos. En cuanto a los mecanismos de acción a nivel intracelular, estos neuropéptidos producen una disminución de los niveles de AMPc así como un incremento en los niveles de IP₃ y en la actividad de la proteína quinasa C, en linfocitos y en macrófagos peritoneales murinos

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION.

1.1. El eje neuroendocrino-Inmune.

La neuroinmunoendocrinología es un área interdisciplinaria de investigación que ha surgido en los últimos años y que estudia las interacciones entre el sistema inmune (S.I.), el sistema nervioso (S.N.) y el endocrino (S.E.).

Los primeros descubrimientos que apuntaban la existencia de esta interconexión se remontan a los estudios de Sir Thomas Lewis (1927), a los trabajos de Selye (1936) sobre la involución tímica y el estrés, y en años posteriores, a los de Meyer y Haggerly (1962) en los cuales se demuestra una clara relación entre el estrés y la susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

Existen evidencias de la Inmunorregulación, *in vivo*, por el sistema neuroendocrino. Jankovic e Isakovic (1973) observaron que la estimulación eléctrica del hipotálamo, o la lesión del mismo, variaba la respuesta inmune. Roszman y cols. (1985) comprobaron que las lesiones en el hipocampo, amígdalas y cuerpos mamilares producían activación de esplenocitos y timocitos en respuesta al mitógeno Con A. Estos autores observaron que tras la extirpación de la hipófisis se perdían estos efectos, deduciendo que las alteraciones inmunológicas debidas a lesiones en el sistema nervioso central son mediadas por la hipófisis u otras glándulas endocrinas.

Por otra parte, se ha comprobado también que las células del sistema inmune secretan sustancias que afectan al S.N. o son constituyentes del mismo, y además son capaces de producir, bajo estímulos específicos, hormonas propias del S.E (Blalock y cols., 1985).

El S.N. puede regular al S.I. a través de dos vías principales: la secreción neuroendocrina de hormonas que pueden viajar por el sistema circulatorio hasta los órganos inmunes y la inervación de los órganos linfoides. El S.N. autónomo facilita esta comunicación entre los sistemas nervioso e inmune a través de su extensiva inervación de los órganos linfoides primarios y secundarios. Las fibras del sistema noradrenérgico se distribuyen a lo largo de la vasculatura hasta el interior del timo, la médula ósea, el

bazo, ganglios axilares y tejido linfoide asociado al tracto digestivo (GALT) (Folten y cols., 1985; Bollinger y cols., 1989).

Por otra parte, las células inmunes gracias a un elaborado sistema de recirculación, pueden viajar por todo el organismo, por el sistema circulatorio a los tejidos y de éstos al sistema linfático, cerrando el circuito, de forma que tienen la oportunidad constante de entrar en contacto con posibles partículas invasoras y al mismo tiempo con productos del S.N. y del S. E. (Picker, 1992).

En el contexto de esta bidireccionalidad entre el S.N. y el S.I., surge la idea de que una importante función del S.I. puede ser actuar como órgano sensorial. El sistema inmune puede percibir estímulos no reconocidos por el sistema nervioso central y periférico, estímulos denominados "no cognoscitivos" como pueden ser: bacterias, tumores, virus, etc. Ese reconocimiento, además de generar una respuesta inmune, se convierte en información, en forma de hormonas y citocinas que pueden modular la función del sistema neuroendocrino. De igual manera, el reconocimiento de los estímulos "cognoscitivos" por parte del S.N. da lugar a una información que es transmitida mediante neurotransmisores y hormonas a receptores específicos en células inmunocompetentes, sucediéndose una serie de cambios en la respuesta inmune (Blalock, 1984). La existencia de esta comunicación bidireccional solo es posible gracias a que los sistemas inmune y neuroendocrino comparten hormonas y receptores (Blalock y cols., 1985a).

De esta forma, el sistema inmune a través de toda la serie de mecanismos que constituyen la respuesta inmune, va a regular junto con el S.N. y el S.E. la homeostasis general del organismo (Boscdovsky y cols., 1985).

1.2. Agentes Inmunes que afectan al sistema neuroendocrino

Las citocinas, sustancias características de secreción inmune, tienen un efecto modulador sobre el sistema nervioso regulando, también la acción de diversas hormonas y neurotransmisores. El sistema neuroendocrino tiene receptores para estas sustancias de secreción inmune, como: Interferones, diversas Interleucinas, o fragmentos del complemento (Welgent y Blalock 1987).

Los **Interferones (IFN)**, citocinas de acción fundamentalmente antiviral, fueron los primeros productos de macrófagos y linfocitos en los que se observó una función

hormonal. Los IFN α / β tienen un efecto esteroidogénico parecido al de la ACTH en células adrenales en cultivo (Blalock y Harp, 1981) y causan elevación en los niveles de cortisol circulante (Roosth y cols., 1986). El IFN α humano se une a receptores oploides de cerebro de ratón *in vitro* y causa una respuesta analgésica similar a las endorfinas (Blalock y Smith, 1981), lo que explica los efectos, a nivel neuropsiquiátrico, de esta citocina *in vivo* (Adams y cols., 1984).

La **Interleucina 1 (IL-1)** es secretada por macrófagos, astrocitos y otras células de la glía (Fontana y cols., 1982). Junto al TNF α ha sido asociada a desórdenes del SNC como la astrogliosis, proliferación de células de la microglía y desmielinización (Giulian y cols., 1988; Merrill, 1991). Tiene un efecto pirógeno debido a su acción sobre el hipotálamo a través de receptores oploides (Norman y cols., 1986). Esta citocina estimula en hipocampo la liberación de CRF y prostaglandinas (Guaza y Borrell, 1993), la biosíntesis de somatostatina (Scarborough y cols., 1989) e incrementa la liberación de ACTH (Uohar y cols., 1987) a nivel pituitario (Cambronero y cols., 1992), así como la de LH, GH y TSH (Bernton y cols., 1987). También actúa sobre la glándula adrenal activando la producción de glucocorticoides (Roth y cols., 1987; Andreis y cols., 1991), así como sobre el sistema nervioso simpático estimulando la producción de catecolaminas (Haeffel y cols., 1993).

La **Interleucina 2 (IL-2)**, factor de crecimiento de linfocitos T, causa elevación en los niveles de ACTH y cortisol (Lotze y cols., 1985) y en la liberación de CRF y prostaglandinas (Cambronero y cols., 1992b; Guaza y Borrell, 1993), siendo además un importante factor de crecimiento tisular (Green y cols., 1984).

El **factor de necrosis tumoral (TNF)**, es producido, en el sistema nervioso, por astrocitos activados y células de la microglía (Lieberman y cols., 1989). Inhibe la secreción de hormonas hipofisarias como la GH, LH y PRL (Walton y Cronin, 1989; Galliard y cols., 1990). Además parece intervenir en la modulación de la secreción folicular de progesterona y estradiol (Punnonen y cols., 1992). Y también está implicado en el desarrollo neuronal (Merrill, 1992).

La **Interleucina 6 (IL-6)**, está relacionada con las patologías del SNC producidas por virus (Frel y cols., 1988; Van Damme y cols., 1989) y estimula la

secreción de las hormonas hipofisarias PRL, GH y LH (Spangelo y cols., 1989).

En la siguiente tabla se recogen una serie de hormonas y neuropéptidos que son modulados por citocinas.

Efectos Neuroendocrinos de Citocinas

Citocina	Hormona afectada
IL-1	CRF, somatostatina, ACTH, TSH, LH, FSH, PRL, GH, corticoesteroides
IL-2	ACTH, β -endorfina, corticoesteroides
IL-6	GH-RH, TRH, ACTH, LH, PRL, GH
TNF	CRF, TRH, PRL, T3, T4
INF	CRF, ACTH, corticoesteroides
Hormonas Tímicas	Gn-RH, ACTH, β -endorfina, LH, PRL, GH, corticoesteroides

FSH, hormona folículo estimulante; PRL, prolactina; GH-RH, hormona liberadora de hormona del crecimiento. (Homo-Delarche F. y M. Dardenne, 1993).

El S.I. se comporta, además, como un órgano neuroendocrino ya que las propias células inmunocompetentes secretan sustancias típicamente endocrinas como serotonina, endorfinas, somatostatina, CRF, PRL, ACTH, TSH, GH, VIP o sustancia P (Weigert y cols, 1990). Sin embargo los niveles de estos factores secretados por la células inmunes nunca alcanzan las cantidades de producción de hipotálamo o hipófisis. Lo que sí parece claro es su papel en una regulación paracrina (Homo-Delarche y Dardenne, 1993).

Desde un punto de vista fisiológico, la producción de hormonas y neuropéptidos por células inmunes favorece la respuesta del S.NE. frente a agresiones que no podría detectar de otra manera, y además, propicia la regulación autocrina del S.I., dado que como veremos en el apartado siguiente, estas sustancias son inmunomoduladoras.

1.3. Inmunomodulación por el sistema nervioso y endocrino.

El control que sobre el S.I. ejercen los otros sistemas reguladores, el S.N. y el S.E., es llevado a cabo a través de la acción que los mediadores moleculares de los

mismos tienen sobre la actividad de las células inmunocompetentes. La amplia inervación noradrenérgica y peptidérgica de los tejidos linfoides sugiere una realidad física en la que basar esta regulación (Stead y cols., 1987).

Para que tenga lugar una acción de los mediadores producidos por el S.N. y el S.E. sobre el S.I. *in vivo*, es necesario que estas sustancias estén presentes localmente en concentración suficiente para provocar una respuesta. Por eso es tan importante la relación microanatómica de los nervios periféricos con las células inmunes.

Se ha encontrado inervación en órganos linfáticos primarios y secundarios, como la médula ósea, timo, bazo, amígdalas y nódulos linfáticos (Folten y cols., 1985). Los trabajos de Folten y su grupo demuestran que son las zonas T dependientes de estos órganos las que están inervadas predominantemente.

La modulación de la respuesta inmune por el S.N. y el S.E. puede ser, lo que podríamos llamar, una regulación a larga distancia, en el caso de mediadores hormonales o una regulación local, en el caso de neurotransmisores y neuropéptidos que son producidos en cantidades relativamente pequeñas y tienen una vida corta debido a su mayor sensibilidad a las enzimas hidrolíticas.

En este intrincado contexto, se puede sugerir un control paracrino y autocrino de las células inmunocompetentes, ya que los neuromoduladores no llegan a estas células solamente gracias a la inervación de los órganos inmunes sino que ellas son capaces de sintetizarlos como hemos apuntado en el apartado anterior (Homo-Dolarcho y Dardenne, 1993).

1.3.1. Agentes nerviosos y endocrinos que regulan la actividad de las células inmunes.

De las numerosas hormonas y neurotransmisores conocidos, algunos de ellos han sido investigados en cuanto a su posible acción sobre la función inmune. Estos mediadores modifican la actividad y el metabolismo de las células inmunocompetentes actuando a los más diversos niveles. Debido a su gran número es muy difícil citar todos los efectos de estos agentes sobre la respuesta inmune, por lo que centraremos nuestra atención en los que resultan más relevantes, y describiremos de forma abreviada lo que se conoce de ellos en el aspecto que nos ocupa.

1.3.1.1. Neurotransmisores y hormonas.

1.3.1.1.1. Eje hipotálamo-hipófisis.

La existencia de inmunoreactividad para el factor liberador de corticotropina (CRF) en linfocitos de sangre periférica humana (Ritchie y cols., 1986) sugiere una posible fuente de CRF en bazo por secreción paracrina, además de su liberación por neurosecreción. Estos hechos, así como la presencia de receptores en las células inmunes (Audhya y cols., 1991; Webster y cols., 1990), apoyan el posible papel inmunomodulador del CRF. De hecho se ha observado que promueve la secreción de β -endorfina por células B (Kavelaars y cols., 1989) y reduce la actividad NK esplénica en ratas (Irwin y cols., 1992).

La hormona adrenocorticotropa (ACTH) hipofisaria inhibe la síntesis de anticuerpos (Johnson y cols., 1982) a la vez que promueve la proliferación de linfocitos B (Alvarez-Mon y cols., 1985). Inhibe la producción de IFN γ por linfocitos T (Johnson y cols., 1984) y modula la expresión de receptores en estas células y en macrófagos (Ader y cols., 1990; Zwilling y cols., 1992). Ha sido identificado el receptor para ACTH en células inmunes (Bost y cols., 1985, 1987; Smith y cols., 1987), mostrando características bioquímicas y estructurales semejantes a su receptor en células adrenales.

La tirotrina (TSH) es producida por células inmunes (Smith y cols., 1983; Kruger y Blalock, 1989), las cuales poseen receptores específicos para ellas (Kruger y Blalock, 1989), y junto a su factor liberador hipofisario, TRH, estimulan la producción de inmunoglobulinas (Blalock y cols., 1985b).

La hormona del crecimiento (GH), secretada por la adenohipófisis, tiene receptores en células inmunocompetentes (Welgent y cols., 1990; Ader y cols., 1990) que son también capaces de secretarla (Welgent y cols., 1990). Sus efectos son restauradores sobre una serie de parámetros inmunológicos, como la actividad de células NK y la respuesta de linfocitos a mitógenos (Berczi I., 1986; Davila y cols., 1987; Haddad y Mashaly, 1991), así mismo estimula la producción de IL-1 e IL-2 (Schimpff y Repollin, 1990). Activa los macrófagos facilitando la formación de radicales libres oxidativos (Edwards y cols., 1992) y también lo hace en neutrófilos (Spadoni y cols.,

1991). Aunque los linfocitos produzcan GH, parece esencial la secreción de esta hormona por la hipófisis para que pueda desarrollar sus efectos sobre la respuesta inmune, de ahí que se implique también indirectamente en éstos a su factor liberador hipotalámico GRF (Nagy y cols., 1983; Krueger y cols., 1989).

Se identificaron receptores para la **prolactina (PRL)** en leucocitos mononucleares y linfocitos T y B esplénicos y de sangre periférica (Russell y cols., 1985; Burckley y cols., 1985). Del papel inmunorregulador de esta hormona destaca su capacidad estimuladora en la producción de IL-2 y en la respuesta celular a mitógenos, concretamente a Con A, y así mismo la disminución en las funciones supresoras celulares (Vidollor, 1986).

El **factor hipotalámico liberador de LH (LHRH)** induce la regeneración del timo en ratas viejas (Groenstein y cols., 1987). Se han descrito receptores específicos en timo de rata y la estimulación de la blastogénesis de timocitos en respuesta a Con A (Marchetti y cols., 1989). Así mismo se encuentran efectos similares para las hormonas LH y FSH (Costa y cols., 1990).

La acción de la **melatonina** sobre el sistema inmune ha sido recientemente respaldado por el descubrimiento de receptores específicos en linfocitos humanos (López-González y cols., 1992a) y esplenocitos de pollo (Pang y Pang, 1992). Los efectos, hasta ahora encontrados, incluyen la estimulación de la producción de anticuerpos en ratones (Maestroni y cols., 1986; 1987 y 1988), la activación de la citotoxicidad natural (Del Gobbo y cols., 1989) y la dependiente de anticuerpo (Giordano y Palermo, 1991).

También se ha estudiado el efecto inmunorregulador de la somatostatina que comentaremos en el apartado de neuropéptidos y hormonas gastrointestinales, por encontrarse también en esta localización.

1.3.1.1.2. Hormonas adrenomedulares.

A primeros de los ochenta se describe, como un aumento en los niveles de **catecolaminas**, en concreto **adrenalina**, provoca un incremento en el número de linfocitos y neutrófilos circulantes (Boxer 1980; Robertson 1981). Estos autores

demuestran que la adrenalina actúa sobre las células endoteliales produciendo un aumento en la liberación de AMPc, disminuyendo la adherencia de los neutrófilos al endotelio. Las células inmunes poseen receptores β -adrenérgicos de alta afinidad, que han sido identificados en linfocitos (Khan y cols., 1986) y en macrófagos (Nowell y cols., 1981; Abrass y cols., 1985). Estudios *in vitro* han mostrado que el tratamiento de linfocitos humanos con el agonista β -adrenérgico isoproterenol reduce la producción de IL-2 e IFN γ , la presencia de receptores de IL-2, la capacidad citotóxica, la producción de anticuerpos, así como la producción de IL-1 por monocitos (Bourne y cols., 1974; Feldman y cols., 1987; Kammer, 1988). Este último autor explica el efecto inhibitorio de las catecolaminas sobre la respuesta inmune, en base al aumento de los niveles de AMPc que éstas producen en linfocitos.

1.3.1.1.3. Hormonas adrenocorticales.

En 1978, Moorthy y Zinnerman señalan los efectos supresores que sobre el sistema inmune son producidos por una liberación de **glucocorticoides** como las que tienen lugar tras una actividad estresante. Estos efectos supresores están en parte mediados por la inhibición de la producción de interleucinas, como la IL-2 (Gillis y cols., 1979) o la IL-1 (Lew y cols., 1988; Hurme y cols., 1991) a nivel de células inmunocompetentes. A nivel de hipocampo la expresión de receptores para IL-1 no se encuentra regulada por estas hormonas (Betancur y cols., 1994). Se ha observado que los glucocorticoides interfieren en la secreción de leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas, lo que provoca un descenso de las reacciones inflamatorias y además, disminuye las reacciones de injerto contra huésped y la inmunidad antitumoral producida vía monocito-macrófago y células NK (Nair y Schwartz, 1984; Guyre y Munk 1989; Callewaert y cols., 1991; Manso y cols., 1992). Estos últimos autores proponen como vía de disminución de la actividad inmune en monocitos y macrófagos, la inhibición del metabolismo del ácido araquidónico en estas células. En leucocitos, en general, y en otros tipos de células, estas hormonas promueven la síntesis de lipocortina 1, la cual regula negativamente la actividad de linfocitos polimorfonucleares (PMNs) y monocito-macrófagos (Goulding y Guyre 1993).

1.3.1.1.4. Hormonas sexuales.

La interacción de las hormonas sexuales con el sistema inmune se pone de

relieve en el hecho de que en general se observa en hembras una respuesta inmune mayor que en machos a todos los niveles (Grossman y cols. 1984). Diversos investigadores estudiaron la respuesta inmune en animales gonadectomizados y los resultados obtenidos incluyen la estimulación de la transformación blastogénica de linfocitos T (Grossman y cols., 1982) y la disminución del tiempo de rechazo de injertos (Graff y cols., 1983). Se comprobó que la progesterona provocaba una disminución del rechazo a injertos (Munroe, 1971), hecho que se confirmó posteriormente (Szekeres-Bartho y cols., 1983). Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado la actividad inmunosupresora del plasma seminal (Carrh y cols., 1990).

1.3.1.1.5. Otras hormonas y neurotransmisores.

La **acetilcolina**, neurotransmisor parasimpático, parece tener efectos positivos sobre la respuesta inmune (Strom y cols., 1974; Malinsky y cols., 1988) y se han encontrado receptores nicotínicos y muscarínicos en linfocitos (Berczi, 1989). A través de receptores específicos estimulan la función de las células T citotóxicas (Strom y cols., 1981) así como su proliferación (Strom y cols., 1981; Morgan y cols., 1984). El antagonista muscarínico, atropina, disminuye la producción de IgA a través de receptores de baja afinidad en células B (Wilson y cols., 1982; Atweh y cols., 1984; Abo y cols., 1986).

La **serotonina** ha sido relacionada con enfermedades autoinmunes como la encefalomielitis (Scott y cols., 1983). Inhibe la proliferación en respuesta a PHA (Bonnet y cols., 1984; Khan y cols., 1986), estimula la citotoxicidad NK (Hellstrand y Hermodson, 1987) y modula la fagocitosis (Sternberg y cols., 1986). Estos efectos parecen ser específicos puesto que se han encontrado receptores en linfocitos (Fillon y cols., 1989).

La **calcitonina** y el **cGRP** parecen tener también receptores en las células inmunes (Body y cols., 1990). La calcitonina es quimioatrayente para monocitos, mientras que no lo es el cGRP (Sacerdote y cols., 1990), este último inhibe la proliferación de linfocitos T en respuesta a mitógeno (Umeda y cols., 1988).

Se han detectado receptores para la **hormona paratiroidea (PTH)** en linfocitos (Perry y cols., 1984). Esta hormona inhibe la linfoproliferación inducida por

lectinas y este efecto parece mediado por una proteína relacionada que actuaría como factor inhibidor del crecimiento (Adachi y cols., 1990).

La **vitamina D**, además de su papel en la homeostasis del calcio, está también implicada en la respuesta inmune (Tsoukas y cols., 1984). Así, estimula la diferenciación y maduración de células mieloides (Abe y cols., 1981). Existen receptores para 1,25-dihidrocolecalciferol o vitamina D3 en linfocitos T y B activados (Bhalla y cols., 1983; Provedini y cols., 1983; Manolagas y cols., 1990). La administración de dosis farmacológicas de vitamina D *in vitro* suprime la producción de IL-2 e IFN γ , la proliferación linfoide y la producción de anticuerpos (Lemire y cols., 1985). Este último efecto podría ser debido a la inhibición producida sobre el receptor de IL-2 en células B (Chen y cols., 1987).

1.3.1.2. Neuropeptidos y hormonas gastrointestinales

Merecen una especial atención un grupo de péptidos que actúan como neurotransmisores en el sistema nervioso central, S.N.C., y que también son producidos en terminaciones nerviosas periféricas que inervan el tracto digestivo, siendo además algunos de ellos producidos por células de tipo endocrino.

Algunas de estas sustancias han sido encontradas en altas concentraciones en los focos inflamatorios, como es el caso de la **sustancia P (SP)**, perteneciente a la familia de las taquininas y uno de los neuropeptidos en los que primero se descubrió su acción reguladora sobre el sistema inmune, en concreto, su papel en la respuesta inflamatoria. La SP estimula la liberación de histamina por mastocitos, aumenta la proliferación de fibroblastos, y la secreción de prostaglandinas y de colagenasa en sinoviocitos. Así mismo produce un aumento de la permeabilidad vascular, favoreciendo el tráfico celular hacia el foco inflamatorio (Marasco 1981, Pernow 1983).

Existen receptores para SP en la población linfoide de bazo y ganglios (Payan y cols., 1984a; Stanisz y cols., 1987). También los macrófagos peritoneales poseen receptores para SP (Hartung y cols., 1986). Este péptido es además sintetizado por eosinófilos (Aliakbar y cols., 1987) y macrófagos (Pascual y Bost, 1990). Sus efectos sobre el sistema inmune son en general estimuladores. Activa la proliferación linfoide, aumentando la síntesis de ADN inducida por Con A en linfocitos de bazo, placas de

Peyer y ganglios linfáticos (Payan y cols., 1983 y 1984a; Stanisiz y cols., 1986 y 1987; Stead y cols., 1987), estimula la síntesis de inmunoglobulinas (Stanisz y cols., 1986; Stead y cols., 1987; Pascual y cols., 1991) y la producción de IL-2 (Calvo y cols., 1992; Rameshwar y cols., 1992) y de IFN γ (Wagner y cols., 1987). También estimula la actividad citotóxica NK (Blennenstock y cols., 1989; Croitoru y cols., 1990). Aumenta la fagocitosis (Bar-Shavit y Goldman, 1980), adherencia a endotelio (Payan y cols., 1984c) y la quimiotaxis (Hartung y Toyka, 1983; Ruff y cols., 1985), así como el metabolismo oxidativo en neutrófilos, medido como emisión de quimioluminiscencia (Halstrom y cols., 1989) y en estos mismos fagocitos estimula la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (Wozniak y cols., 1989). Es un factor quimiotáctico para monocitos (Ruff y cols., 1985) y en macrófagos estimula la liberación de mediadores derivados del ácido araquidónico, de radicales libres del oxígeno y la producción de enzimas lisosómicas (Hartung y cols., 1983 y 1986; Marasco y cols., 1981). Además estimula la fagocitosis y quimiotaxis en estas células (McGillis y cols., 1987; Ruff y cols., 1985) y facilita la secreción de citocinas como TNF, IL-1 o IL-6 (Lotzo y cols., 1988).

En cuanto a los mecanismos de acción parece ser que actúa elevando los niveles de calcio citosólico y favoreciendo la formación de inosítoles fosfato (Serra y cols., 1988) actuando presumiblemente vía proteínas de unión al GTP (Shumann y Gardner 1989). Otras taquininas, como la bradiquinina, neuroquinina A o neuromedina M producen efectos similares.

El efecto sobre la función inmune de otro neuropéptido, también producido en el tracto digestivo, la **neurotensina**, fue investigado por el grupo de Goldman y Bar-Shavit a primeros de los 80, en concreto comprobaron su unión específica a macrófagos murinos lo que se traducía en una estimulación de su actividad fagocítica (Bar-Shavit y cols., 1982). Así mismo, demostraron que la neurotensina es capaz de orientar la migración de leucocitos polimorfonucleados neutrófilos e incrementar la fagocitosis de partículas inertes activando a nivel intracelular la liberación de calcio (Goldman y cols., 1983).

La neurotensina y el otro neuropéptido estructuralmente relacionado con el que comparte los cuatro aminoácidos C-terminales, la **neuromedina N**, estimulan la adherencia y quimiotaxis de linfocitos peritoneales murinos (Garrido y cols., 1992), así como todas las etapas del proceso fagocítico en macrófagos (De la Fuente y cols., 1993c). Estimula también la proliferación linfoide (Soder y Helstrom, 1987), la

producción de IL-1 por macrófagos alveolares activados (Lemaire, 1988) y la formación de colonias progenitoras de células mononucleadas dependientes de CSF-1 (Moore y cols., 1989).

Otros neuropéptidos gastrointestinales como la somatostatina o el péptido intestinal vasoactivo (VIP), parecen ejercer un efecto modulador inhibitorio sobre las células inmunocompetentes.

En 1981 Bathena y cols. identifican receptores para **somatostatina** en linfocitos y en monocitos circulantes. Posteriormente, se encontraron receptores para somatostatina en linfocitos esplénicos y en placas de Peyer (Scicchitano y cols., 1987; Stead y cols., 1987) así como en células de la línea mielóide (Weigent y cols., 1990). Pero no sólo existen receptores para este péptido en células inmunes sino que, posiblemente, éstas lo sintetizan. Así, se comprobó la presencia de somatostatina tanto en PMNs y linfocitos de sangre periférica (Lygren y cols., 1984; Weinstock y cols., 1988), como en el timo de rata (Gomariz y cols., 1990). Pronto se descubrió su efecto inhibitorio sobre la proliferación linfóide (Payan 1984b; Mascards 1984). Si bien los estudios posteriores muestran resultados contrarios, Johansson y Sandberg (1989) obtienen un aumento de la proliferación espontánea de linocitos, así como de la proliferación en respuesta a PHA. En experimentos *in vivo* Stanisz y cols. (1987) también observan una estimulación de la proliferación linfóide.

Por su parte ha sido encontrada inmunoreactividad para VIP en linfocitos de la corteza tímica y en áreas T-dependientes de bazo y ganglios axilares de rata y ratón (Gomariz y cols., 1990 y 1992). También se ha encontrado VIP en leucocitos polimorfonucleares (O'Dorisio y cols., 1980; Lygren y cols., 1984) Se han detectado receptores para VIP en linfocitos T y B, así como en macrófagos y monocitos (Guerrero y cols., 1981; Danek y cols., 1983; Ottaway y Greenberg, 1984; O'Dorisio y cols., 1987 y 1989; Wood y O'Dorisio, 1985; Calvo y cols., 1986; Finch y cols., 1989; Roberts y cols., 1991; Segura y cols., 1991). Se ha comprobado la expresión génica de VIP en linfocitos de bazo y timo de rata (Gomariz y cols., 1993 y 1994)

La actividad de linfocitos T y B se ve afectada por el VIP. Este inhibe la proliferación linfóide en respuesta a Con A y PHA, así como la secreción de IL-2 en linfocitos T estimulados (Ottaway y Greenberg, 1984; Ottaway, 1987; Boudard y Bastido, 1991; Ganua y Sun, 1993), estos últimos autores sugieren que este efecto

puede estar mediado por AMPc ya que observan un rápido incremento de su concentración a nivel intracelular. El VIP también ejerce su acción sobre la secreción de inmunoglobulinas, estimulando la producción de IgA (Stanisz y cols., 1986; Ishloka y cols., 1992). Afecta a la migración, inhibiendo el tráfico de linfocitos (Ottaway, 1984 y 1985; Moore, 1984; Moore y cols., 1988) y reduce la actividad NK (Rola-pleszczynski y cols., 1985; Sirianni y cols., 1992).

Sobre las células fagocíticas el VIP ejerce un papel estimulador de la fagocitosis y la digestión, incrementando intracelularmente la actividad de la proteína quinasa C (De la Fuente y cols., 1993b). Por otra parte, también estimula la producción de AMPc en macrófagos peritoneales de rata (Segura y cols., 1992). Aumenta la adherencia a sustrato *in vitro* de macrófagos y linfocitos peritoneales, estimulando además la capacidad quimiotáctica de los primeros y reduciéndola en los linfocitos (De la Fuente y cols., 1994, en prensa).

Recientemente neuropéptidos de la familia del polipéptido pancreático, el **neuropéptido Y (NPY)** y el **péptido YY**, han sido relacionado con el sistema inmune. Estos péptidos, que comparten un 70% de homología en su estructura, son liberados por fibras simpáticas en órganos linfoides: timo, ganglios mesentéricos y bazo en el caso del NPY, y por células endocrinas en el caso del PYY. La acción del NPY en los órganos inmunocompetentes indicados podría ser directa o potenciando los efectos de la noradrenalina (Romano y cols., 1991). El NPY disminuye la estimulación de la proliferación de linfocitos de rata en respuesta a PHA (Soder y Hellstrom, 1987) y no estimula por sí mismo la proliferación espontánea (Johansson y Sandberg, 1989). En cuanto a la actividad citotóxica Irwin y cols. (1991) observaron una correlación negativa entre la concentración plasmática de NPY y dicha actividad en células inmunes de enfermos con Alzheimer. Recientemente, Nair y cols. (1993) han observado una reducción de la citotoxicidad natural (NK) de linfocitos normales, a concentraciones fisiológicas del NPY.

Nuestro grupo ha demostrado que tanto el NPY como el péptido YY se unen específicamente a macrófagos murinos provocando un incremento de los niveles de inositol trifosfato y activación de la proteína quinasa C, lo que se traduce en una modulación positiva de todas las etapas del proceso fagocítico (adherencia, quimiotaxis, ingestión y digestión) de estas células (De la Fuente y cols., 1993a).

Varios estudios apuntan hacia un posible papel inmunomodulador de la **colecistoquinina (CCK)**. Ferrara y cols. (1989) y Mc Millen y cols. (1990) comprobaron que la CCK-8 actúa como inhibidor de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica humana cuando las cantidades de PHA utilizadas eran óptimas para la mitogénesis. Nuestro grupo ha observado también la disminución por CCK-8s de la proliferación de linfocitos humanos en respuesta a PHA y el aumento, que, sin embargo, produce en la proliferación espontánea (en ausencia de mitógeno) (Carrasco y cols., 1990). Por su parte, Mihás y cols. (1991) aunque coinciden en que la CCK inhibe la transformación linfoblástica inducida por PHA en linfocitos humanos no obtienen diferencias en los cultivos incubados con CCK en ausencia del mitógeno con respecto a los controles. Los autores postulan un posible mecanismo de acción a través del aumento del contenido de AMPc intracelular.

En neutrófilos humanos se ha observado un aumento de la capacidad de adherencia y una disminución de la fagocitosis (Carrasco y cols., 1991). También en macrófagos se produce una inhibición del proceso fagocítico (De la Fuente y cols., 1993b). Según Numao y Agrawal (1992) la CCK-8 sulfatada podría tener un papel importante en los procesos de infiltración celular en la inflamación de origen alérgico. Estos autores han detectado una potenciación de la quimiotaxis de eosinófilos humanos inducida por PAF (factor de activación plaquetar) y por LTB₄ en enfermos alérgicos pero no en sujetos normales. De hecho, nosotros hemos observado una inhibición de la quimiotaxis de linfocitos y fagocitos tanto en ratón como en humanos (De la Fuente y cols., 1993b).

La **gastrina** pertenece a la misma familia que la CCK compartiendo con ella los cinco aminoácidos C-terminales. Esta hormona ha sido relacionada con varios tipos de tumores, así la transformación maligna del colon podría suponer una respuesta exagerada a la gastrina circulante o estar asociada con la producción de un péptido muy similar (Hooseln y cols., 1990). La gastrina -17 humana y porcina no tienen efecto sobre la transformación linfoblástica inducida por PHA de linfocitos humanos, incluso a concentraciones elevadas de la hormona (Mihás, 1991). En cuanto a la adherencia y fagocitosis de neutrófilos humanos se comporta como la CCK aumentando la capacidad de adherencia y disminuyendo la fagocitosis (Carrasco y cols., 1991).

En 1981, Hørdemann observa que otra hormona, la **Insulina**, actúa potenciando el ciclo celular de los linfocitos T y su metabolismo. Un año antes se habían descrito receptores para la insulina en células fagocíticas, en concreto en macrófagos (Pederson 1980).

Por otra parte, no caben dudas en cuanto al efecto inmunorregulador de ciertos **péptidos opiáceos** y de la producción de algunos de ellos por células inmunes, como es el caso de la **β -endorfina** encontrada en macrófagos esplénicos de ratón (Lolait y cols., 1984). El efecto de estos péptidos endógenos sobre la respuesta proliferativa varía según las dosis de los mismos y las condiciones de experimentación empleadas. Así se observa una potenciación de la blastogénesis *in vitro*, mientras *in vivo* las dosis altas son supresoras y las bajas activadoras (Plotnikoff y cols., 1983). La **met-enkefalina** parece actuar aumentando la linfoproliferación en respuesta al antígeno (Roscelli y cols., 1988) así como estimula la producción de IL-1 (Si-Xun y Xiao-Yu, 1989). La β -endorfina y la met-enkefalina aumentan la actividad NK o inhiben el crecimiento tumoral *in vivo* (Froelich y cols., 1984; Kay y cols., 1984; Mandler y cols., 1986). Favorecen la quimiotaxis de monocitos (Van Epps y Salad, 1984) y estimulan la liberación de radicales libres en fagocitos (Morley y cols., 1987; Willems y cols., 1988). Existen receptores opioideos en todas las líneas celulares inmunes (Carr y cols., 1988) y también, estos péptidos pueden ser producidos por todas ellas (Weigent y Blalock 1987; Ador y cols., 1990).

Otros péptidos ya comentados como el TRH, GRF o CRF también han sido encontrados en el tracto digestivo pero se han descrito antes por ser más típicos del hipotálamo.

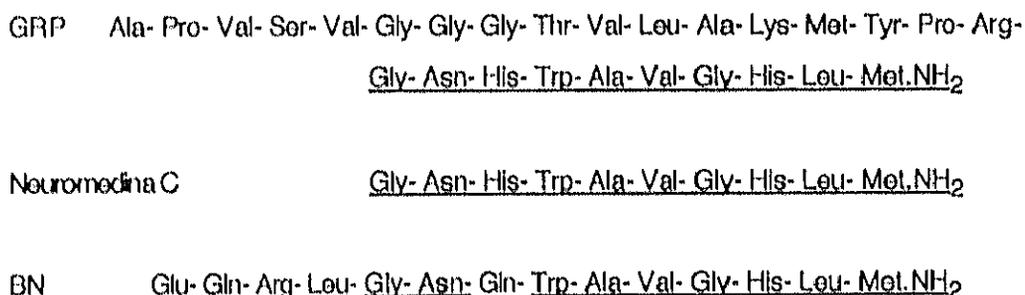
Un comentario especial y en mayor extensión merecen los péptidos pertenecientes a la familia de la bombesina, que han sido el objeto del presente trabajo, por lo que se les dedicará el siguiente apartado.

1.3.1.3. Bombesina (BN) y peptidos relacionados

La bombesina (BN) es un tetradecapéptido que fue aislado de la piel de la rana europea *Bombina bombina* (Anastasi y cols., 1971). Posteriormente, otros péptidos similares en estructura fueron aislados de la piel de otros anfibios (Erspamer y cols., 1988). En 1978 es aislado el llamado péptido liberador de gastrina (GRP) del tracto digestivo porcino (Mc Donald y cols., 1979). El nombre lo recibió por el bioensayo utilizado en su determinación y se ha mantenido aunque hace mención a uno sólo de sus numerosos efectos fisiológicos. Este péptido consta de veintiseis aminoácidos y su fragmento decapéptido C-terminal es idéntico al de la BN y es el requerido por ésta para su unión al receptor (Moody y cols., 1978). Posteriormente fue aislado, de médula espinal porcina, el péptido que constituye el fragmento de diez aminoácidos C-terminales del GRP, el cual fue denominado neuromedina C (Minamino y cols., 1984).

Los estudios sobre los efectos fisiológicos de la BN pueden ser considerados descriptivos de los producidos por el GRP, ya que múltiples resultados han demostrado que ambos péptidos actúan de forma semejante (Mc Donald y cols., 1983).

A continuación, se muestran las secuencias aminoacídicas de los tres neuropéptidos: BN, GRP y neuromedina C, apareciendo subrayada la secuencia que comparten.



Se encontró GRP en el sistema nervioso central (SNC), en el tracto gastrointestinal y en el pulmón. En el SNC, se halló inmunoreactividad positiva en cerebro de anfibios para la BN (Pollak y cols., 1976) y posteriormente en extractos de

cerebro de cobayas y ratas (Roth y cols., 1983; Show y cols., 1987; Hernanz, 1990).

Ha sido comprobado que el GRP ejerce un papel en los mecanismos homeostáticos centrales, así está implicado en termorregulación, ejerciendo un efecto hipotérmico (Taché y cols., 1980). Westendorf y cols., (1982) sugirieron una acción directa de estos neuropéptidos sobre la glándula pituitaria, estimulando la secreción de PRL y GH. Así mismo, el GRP estimula la secreción de muchas hormonas, como la adrenalina y regula la secreción de ácido gástrico y la glucemia (Brown y cols., 1978).

Dentro del tracto gastrointestinal, el GRP se localiza, en la rata, en fibras del plexo miotérico que se encuentra entre las capas musculares, y en el plexo submucoso que contacta con la mucosa del estómago y del Intestino (Dockray y cols., 1979; Hernanz, 1990). Estos descubrimientos indicaban el probable papel como neurotransmisores de esta familia de péptidos en el tracto digestivo de mamíferos. Efectivamente se descubrió que el GRP estimula la secreción de gastrina, insulina, glucagon, polipéptido pancreático y somatostatina (Mc Donald y cols., 1983). Así mismo modula la actividad motora, estimulando la contracción del músculo liso gastrointestinal (Taché y cols., 1980).

También se localiza el GRP en el pulmón. En 1981 se caracteriza un tipo de tumor pulmonar, el SCLC (small cell lung cancer), en base a sus elevados niveles de BN (Moody y cols., 1981). Basado en los estudios realizados por Moody y colaboradores, el grupo de Weber (1985) descubre que el GRP es un mitógeno para las células que constituyen el tumor pulmonar SCLC. La mitogenicidad del GRP reside en su fragmento tetradecapéptido carboxiterminal, es decir el que comparte homología con la bombesina y la más recientemente descubierta neuromedina C. Willey y cols. (1984) observan que la bombesina y el fragmento tetradecapéptido C-terminal del GRP estimulan la proliferación de células humanas normales del epitelio bronquial.

Con posterioridad a estos descubrimientos y en base a ellos, se clonó el mRNA codificador para el GRP de un tumor pulmonar humano que lo contenía (Spindel y cols., 1984) y de células del SCLC (Sausville y cols., 1986). Estos estudios establecieron que el GRP es formado a partir de un precursor polipeptídico que contiene una sola copia del péptido. La secuencia del GRP sigue inmediatamente al péptido señal y a continuación se extiende una larga secuencia polipeptídica carboxiterminal. El genoma humano muestra un gen codificador para el GRP que por análisis citogenéticos ha sido situado en el cromosoma 18.

Análisis por HPLC de proteínas aisladas muestran la formación del GRP-10 (o neuromedina C) *in vivo*. Este decapeptido es probablemente sintetizado por procesos proteolíticos alternos a partir del mismo precursor que el GRP-27 (Spindel, 1986; Spindel y Krane, 1988).

Muchas células tumorales secretan factores de crecimiento autocrinos que estimulan su proliferación. En el caso de las células del SCLC, el GRP se une a receptores en la superficie de estas células, eleva los niveles de Ca^{2+} intracelular y estimula el crecimiento del tumor (Moody y Cuttita, 1993). También hay receptores para BN/GRP en líneas tumorales humanas, en concreto de glioblastoma humano (U-118) y de un carcinoma pulmonar (NCI-H720) de las cuales han sido solubilizados y purificados estos receptores (Staley y cols., 1993).

También la línea celular murina de fibroblastos Swiss 3T3 presenta receptores de alta afinidad para BN/GRP (Zachary y Rozengurt, 1985), los cuales han sido solubilizados y purificados de estas células (Naldini y cols., 1990; Battey y cols., 1991).

El receptor para BN/GRP de las células Swiss 3T3 ha sido además clonado molecularmente (Battey y cols., 1991), y de su análisis estructural, los autores deducen que dicho receptor es miembro de la superfamilia de receptores dependientes de proteína G, que une nucleótidos de guanina (GTP), estando constituido por sus característicos siete dominios transmembranales hidrofóbicos. Esta posibilidad había sido también apuntada por Sinnott-Smith y cols., en 1990, al observar una pérdida de afinidad del GRP por los receptores al añadir nucleótidos de guanina. En las células Swiss 3T3 estos péptidos estimulan la síntesis de DNA a concentraciones nanomolares y en ausencia de ningún otro factor de crecimiento o mitógeno (Rozengurt & Sinnott-Smith, 1983). Se conocen bien los mecanismos de acción de estos neuropéptidos en las células Swiss 3T3. Tras la unión de la BN/GRP al receptor, este interactúa con la subunidad de unión al GTP (Fischer y Schonbrun, 1988) y se elevan los niveles de inositol 1,4,5-trisfosfato y de calcio intracelular (Heslop y cols., 1986; Mendoza y cols., 1986), se activa la proteína quinasa C (Zachary y cols., 1986) y se inducen los oncogenes *c-fos* y *c-myc* (Letterio y cols., 1986).

En esta misma línea, Patel y Srey (1990) demuestran la implicación de la bombesina en el cáncer de mama, ya que la incubación con el neuropéptido produce una activación de la ruta del inositol trifosfato y elevación del flujo de calcio, ambas señales mitogénicas. Coincidentes con estos resultados en cuanto a los mecanismos de acción a nivel intracelular, Swope y Schonbrun (1988) determinaron la ruta seguida

por la bombesina en la estimulación de la secreción de insulina, que implica una elevación de los niveles de calcio y activación de la proteína quinasa C.

Una vez probada la acción del GRP como potente factor de crecimiento en diferentes tumores, creció el interés en encontrar antagonistas que compitieran por el receptor para GRP en estas células. Coy y cols. (1990), llevaron a cabo un estudio sobre análogos de BN/ GRP con actividad como antagonistas y describieron estrategias para obtener pseudopéptidos que mantuviesen su capacidad antagonista pura, sin expresar ninguna actividad como agonistas, como había ocurrido hasta entonces. En este sentido, Szepeshazi y cols. (1992) proponen la posible aplicación terapéutica de un antagonista de la bombesina obtenido sintéticamente, el RC-3095, el cual actúa inhibiendo el crecimiento de un tipo de cáncer de mama en ratones. Al parecer la inhibición se relaciona con una disminución, en presencia del antagonista de la bombesina, en la capacidad de unión, a sus receptores, del factor de crecimiento epidérmico (EGF), más que con una competición por el propio receptor. Recientemente Liebow y colaboradores (1993) han observado que el antagonista de la BN, RC-3095, es capaz de retrasar significativamente el desarrollo de un tipo de cáncer provocado experimentalmente tras la administración del carcinógeno dimetilbenzantraceno (DMBA).

Aunque se han encontrado receptores de alta afinidad para un número considerable de hormonas y neuropéptidos en leucocitos, no han sido aún descritos para la familia de la bombesina. Sin embargo, si parece probado que estos péptidos tengan efectos inmunomoduladores, si bien los resultados a este respecto son todavía escasos y puntuales.

Ruff y cols. (1985), observan que la bombesina es un potente quimioatrayente para monocitos humanos y células del SCLC, pudiendo consistir su papel en mantener localizado el tumor. Sugieren que una alteración en la producción o regulación de la migración celular por éste y otros neuropéptidos, podría ser responsable de la dispersión del tumor. En los años siguientes, el grupo de Wiedermann demuestra que macrófagos alveolares de rata secretan bombesina y también lo hacen, en mayor medida, los obtenidos de ratas que desarrollan procesos fibróticos (Wiedermann y cols., 1986 y 1988). Los autores postulan que la BN, quimioatrayente para monocitos según Ruff y cols., actuaría reclutando macrófagos hacia los alveolos. Esto podría favorecer el aclaramiento de partículas indeseables (carbón, sílice, etc) no obstante, un exceso de secreción de BN también podría desembocar en una transformación

neoplásica en el pulmón, teniendo por lo tanto consecuencias patológicas.

En estudios con pacientes de bronquitis crónica, Meloni y cols. (1992) demuestran la presencia de bombesina en células de la línea monocito-macrófago de sujetos normales, llegando a niveles altos en pacientes con bronquitis crónica. Estos hechos parecen apoyar la idea de que estos péptidos desempeñan un papel importante en la respuesta inmunológica a enfermedades pulmonares.

Un estudio con diversos neuropéptidos, entre ellos la bombesina, sobre la proliferación de células obtenidas de nódulos linfáticos de ratón en cultivos mixtos (MLR), revela que ésta es capaz de estimular ligeramente dicho crecimiento, si bien solamente se observa el efecto con concentraciones muy pequeñas del péptido (10^{-14} a 10^{-10} M) (Krcó y cols., 1986).

Fink y cols., (1988) encuentran que la bombesina inhibe la proliferación de células CTLL-2 inducida por IL-2. Estos autores proponen la existencia de receptores específicos para BN en estas células y rechazan que se de una competición por el sitio de unión a la IL-2, a la vista de las curvas dosis-respuesta obtenidas.

Según observan Jin y cols. (1989), la bombesina también regula la actividad de los linfocitos B incrementando la secreción de anticuerpos de tipo IgA e IgG en el intestino de rata en experimentos realizados *in vivo* tras inyección intravenosa de BN.

Los mismos autores (Jin y cols., 1990) estudian también, el posible efecto de estos péptidos sobre la función fagocítica, en concreto analizaron la emisión de quimioluminiscencia por fagocitos murinos en respuesta a GRP y péptidos relacionados y observaron un incremento de la misma. Este hecho es interpretado como una estimulación de la función fagocítica por estos péptidos, dado que los fagocitos activados emiten luz debido al incremento de su metabolismo oxidativo. Además observan que la adición de un quelante de calcio, como el EGTA, reduce la capacidad de respuesta de esas células fagocíticas al GRP, lo cual viene a confirmar la importancia del calcio como mensajero en la transducción de la señal producida por estos péptidos, hecho que ya había sido demostrado en otros sistemas biológicos.

En 1991, Van Tol y colaboradores investigaron, los efectos de la administración intravenosa de BN en voluntarios humanos, en concreto, sobre la actividad citotóxica frente a las células tumorales K562, y observaron un incremento de dicha actividad NK. Previamente habían obtenido resultados similares en experimentos *in vitro* (Van Tol y cols., 1990) aunque los niveles de estimulación obtenidos con BN en este caso fueron

inferiores a los obtenidos *in vivo*.

Como se puede deducir por lo expuesto los trabajos que estudian el efecto de la BN, o péptidos relacionados con ella, en el S.i. son escasos y puntuales.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

En base a los antecedentes existentes, expuestos en la Introducción, parece evidente que el sistema inmune es regulado por los sistemas nervioso y endocrino, si bien no son del todo conocidos los efectos que los mediadores de ambos sistemas producen en las células inmunocompetentes ni los mecanismos de dicha actuación. En este sentido los datos existentes sobre el grupo de hormonas y neuropéptidos son aún más escasos, y dentro de ellos destacan, por la falta de información existente, los péptidos relacionados con la bombesina que se han detectado en mamíferos: el péptido liberador de gastrina (GRP) y la neuromedina C

El objetivo general que ha guiado el presente trabajo de investigación ha sido estudiar el efecto que esta familia de neuropéptidos (bombesina, GRP, y neuromedina C) ejerce sobre la respuesta inmune, lo cual aportaría una prueba más de la interconexión existente entre los sistemas nervioso e inmune. Además, puesto que los trabajos existentes en el campo de la neuroinmunomodulación son puntuales en su abordaje, nos propusimos conocer el efecto de esta familia de péptidos sobre la funcionalidad de los dos tipos principales de células inmunes: linfocitos y fagocitos. Para alcanzar dicho objetivo se eligió un modelo animal de experimentación ampliamente utilizado en inmunología, el ratón, y se estableció un diseño *in vitro* para poder estudiar la acción directa de los neuropéptidos objeto de estudio sin las interferencias que lógicamente tienen lugar *in vivo*.

Este objetivo general se ha parcelado en objetivos más concretos que se enumeran a continuación:

- 1.- Efecto de los neuropéptidos sobre la función de las células fagocíticas. Se eligieron para llevar a cabo este estudio, los macrófagos peritoneales, por ser representativos de este tipo celular, fácilmente obtenibles en las cantidades necesarias, y por ser una población en la que nuestro grupo tiene una gran experiencia, habiéndose desarrollado incluso técnicas originales para la investigación de la misma. El estudio se centra en la función más significativa de estas células, el

proceso fagocítico, considerando todas y cada una de sus diferentes etapas: adherencia a sustrato, quimiotaxis (posible efecto como quimiotáctico y como quimioatractivo), fagocitosis de partículas inertes y de células, y destrucción del material ingerido, esta última etapa del proceso se caracteriza por una serie de actividades de las cuales, una de las iniciales y más implicadas en la propia destrucción es la producción de radicales de oxígeno como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno.

2.- Efecto sobre la funcionalidad de los linfocitos. Se obtienen éstos de tres órganos inmunocompetentes: timo (órgano linfóide central o primario, lugar de diferenciación y producción de linfocitos T), bazo (órgano hematopoyético en el ratón) y ganglios axilares (representativo de los órganos linfoides periféricos o secundarios). Además se incluyen los linfocitos peritoneales por ser una población que comparte localización con los fagocitos que nos proponemos estudiar. En estas células se estudian dos de sus funciones más representativas: la quimiotaxis y la proliferación (bien espontánea o en respuesta a mitógenos).

3.- Efecto sobre la actividad citotóxica. Se estudia por una parte, la actividad citotóxica natural, *natural killer* (NK) en leucocitos obtenidas de peritoneo y de los tres órganos linfoides reseñados en el punto anterior, y por otra parte, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) en las mismas poblaciones de leucocitos.

4.- Modulación por los neuropéptidos de la secreción por células inmunocompetentes de factores de colaboración intercelular: Valoramos los niveles de interleucina 1, factor producido por macrófagos que interviene decisivamente en la estimulación de la proliferación linfóide, y de interleucina 2, producida por los linfocitos y directamente implicada también en linfoproliferación y en la estimulación de la actividad citotóxica. Además medimos los niveles del factor de fusión de macrófagos, IFM, producido por linfocitos y responsable de la formación de las células gigantes multinucleadas (MGC).

5.- Necesidad de la presencia de los péptidos para la obtención de los efectos. Se pretende averiguar si la incubación con los neuropéptidos previa al ensayo es suficiente para que éstos mantengan su efecto o si por el contrario, es necesaria su presencia a lo largo del tiempo que dura el desarrollo de las pruebas.

6.- Especificidad de los efectos observados. Utilizando un péptido que actúa como potente antagonista uniéndose al receptor para la bombesina en otros sistemas, pretendemos comprobar si los efectos obtenidos por nosotros son específicos.

Además, se estudia la posible presencia de receptores en las células inmunes para estos neuropéptidos.

7.- Efecto de los neuropéptidos según el tipo celular. Se pretende estudiar sus efectos en las diferentes poblaciones de leucocitos purificadas en base a su diferente capacidad de adherencia: células adherentes (principalmente macrófagos y linfocitos B) y células no adherentes (población enriquecida en linfocitos T).

8.- Necesidad de la presencia de las célula adherentes para obtener el efecto modulador de los neuropéptidos sobre la función linfoide o posible producción de algún factor por dichas células adherentes que sea el responsable de los efectos observados en linfocitos cuando se analizan en la población leucocitaria.

9.- Mecanismos de acción seguidos por los neuropéptidos a nivel intracelular. Pretendemos determinar la ruta de transducción de la señal de los péptidos estudiados valorando los niveles de segundos mensajeros: AMPc e IP₃, y su posible efecto sobre la actividad enzimática proteína kinasa C (PKC).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES.

3.1.1. Material Biológico

La experimentación se ha realizado en ratones *Mus musculus* de las cepas Swiss y BALB/c procedentes de IFFA CREDO (Centre de recherche et d'élevage des Onais de Saint Germain Sur L'Arbrese en Francia). Fueron mantenidos en el animalario de nuestro departamento en condiciones estándar de alimentación con pienso (PANLAB) y agua *ad libitum*, a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y fotoperiodo invertido. Los animales utilizados fueron machos con una edad de 15 ± 5 semanas.

Las levaduras *Cándida albicans* fueron cedidas por el Dr. Prieto del Depto. de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Las células tumorales de la línea K562 fueron cedidas por el Dr. Alvarez De Mon de la Universidad de Alcalá de Henares.

Las células YAC-1 fueron una cesión del Dr. Subiza del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico de Madrid.

3.1.2. Medios de cultivo.

Sabouraud Gélose/Agar (BioMérieux) se utiliza como medio de cultivo para las levaduras *Cándida albicans*.

Medio de cultivo RPMI 1640 con HEPES 25mM, y enriquecido con L-glutamina 20mM (GIBCO). En cultivos celulares se emplea suplementado con 10% de suero fetal de ternera, SFT (GIBCO) descomplementarizado en baño a 56°C durante 30 min, y como antibiótico se emplea 0.1 mg/ml de gentamicina (GIBCO).

Medio 199 con HEPES 25mM y L-glutamina 20mM (GIBCO).

Medios salinos preparados en el laboratorio con agua tridestillada : solución salina tamponada de fosfatos, PBS, (CLNa 7,20g; PO₄HNa₂ 1,54g; PO₄H₂K 0,44g por l de disolución) y Hank's (glucosa 1g; cloruro magnésico 0,1g; cloruro sódico 8g; cloruro potásico 0,4g; cloruro cálcico 0,14g; fosfato magnésico dibásico 0,1g; fosfato monopotásico 0,06g; fosfato disódico 0,35g por l de disolución). La esterilización de

todos los medios de cultivo se llevo a cabo mediante filtración a través de membrana de 0,22µm de poro (Millipore). Los medios una vez esterilizados se almacenaron a 4°C.

3.1.3. Sueros y anticuerpos.

Suero humano de treinta individuos sanos cedido por el Dr. Hernanz del Servicio de Bioquímica del Hospital de La Paz.

Anti-CD15 (DAKO) utilizado en ensayos de citotoxicidad, se conservó alicuatado a -20°C.

Anti-Thy-1 amablemente cedido por el Depto. de Biología Celular de la UCM.

3.1.4. Mitógenos.

Concanavalina A (Con A, FLOW); lipopolisacarido de *E.Coli* (LPS, SIGMA) y fitohemaglutinina (PHA, Flow).

3.1.5. Neuropeptidos.

Los neuropeptidos objeto del presente estudio: Bombesina (BN), péptido liberador de gastrina (GRP), y Neuromedina C, se obtuvieron de SIGMA. Los tres neuropeptidos fueron reconstituidos en medio salino PBS, alicuatados y conservados a -20°C en congelador. Así mismo se obtuvieron de SIGMA otros neuropeptidos: colicistoquinina (CCK), neuropeptido Y (NPY) y péptido Intestinal vasoactivo (VIP).

3.1.6. Otros péptidos.

Se obtuvieron también de SIGMA los siguientes péptidos: (Leu¹³-ψ-CH₂NH-Leu¹⁴)-BN, antagonista del receptor de la bombesina; forbol miristato acetato (PMA); péptido formilado (F-Met-Leu-Phe, FMLP). Fueron reconstituidos en medio salino PBS, alicuatados y conservados a -20°C

3.1.7. Reactivos químicos.

Acetato de diclorodihidrofluoresceína: (Molecular Probes Inc.).

Acido tricloroacético: al 25% (Merck).

Acido trifluoroacético: preparado al 1N (Pierce).

Adenosina trifosfato: (Boehringer Mannheim).

Aprotinina: (Boehringer Mannheim).

Azida sódica : (Merck).

DAB: (SIGMA)

Diltioleto: (Boehringer Mannheim).

EDTA (ácido etilendiamintetracético):(SIGMA).

EGTA (ácido etilenglicoltetracético): (Boehringer Mannheim).

Extracto de cerebro: (SIGMA), como fuente de fosfatidilserina.

HEPES: (Panreac).

Histona tipo III: (SIGMA).

Isobutil-metil-xantina (IBMX) : (Biomedical Technologies).

Leupeptina: (Boehringer Mannheim).

Líquido de control: (Packard).

Nitroazul de Tetrazolo(NBT): (SIGMA).

PAP: (SIGMA)

Peróxido de Hidrógeno: (Carlo Erba).

Partículas de látex: de 1,091+0,0082 mm de diámetro (SIGMA) diluidas al 1% con PBS estéril, se conservan en nevera hasta su utilización.

Retinal: (SIGMA). Se conservó en alícuotas a -20°C.

Tripsina : (Merck), se reconstituyó al 0,5% en PBS y se conservó a 4°C.

Triton X-100: (Merck).

Otros reactivos : Metanol y etanol (Merck); DIFF-QUICK (DADE Grifols); Azultripan (SERVA); Azul de metileno (PANREAC); dioxano(Merck), ácido clorídrico (Carlo Erba).

3.1.8. Productos marcados con isótopos radiactivos.

Adenosin trifosfato (^{32}P -ATP) (New England Nuclear); timidina (^3H -T) (DuPont); ^{51}Cr (DuPont) ; bombesina (^{125}I -BN) (Amersham); GRP (^{125}I -GRP) (Peninsula).

3.1.9. Kits comerciales.

Radioinmunoensayos (RIA) de AMPc (AMERSHAM) e IL-1 β (Advanced Magnetics, MA); ELISA para determinación de IL-2 (Collaborative Res. Inc., Bedford, MA); ELISA para la valoración de citotoxicidad (PROMEGA). Ensayo de radioreceptor para IP $_3$ (AMERSHAM).

3.1.10. Material de laboratorio de especial interés.

Cámaras de Boydon utilizadas en las pruebas de quimiotaxis. El diámetro interno de las cámaras es de 9 mm, el externo de 13 mm y la altura de 5 mm en cada compartimento.

Filtros (MILIPORE) de nitrocelulosa transparentables de 13 mm de diámetro y de 3 mm de tamaño de poro utilizados en las pruebas de quimiotaxis.

Filtros (MILIPORE) de 13 mm de diámetro y de 0.22 mm de poro para la esterilización de medios.

Frascos de cultivo de 25 ml (Falcon, Collaborative).

Mallas para el macerado de órganos (Sigma).

Hemocitómetro de Neubauer.

Lana de nylon (Du Pont).

Papel de filtración (Whatman GF/C).

Papel de filtración (MILLIPORE AP-40).

Placas de M.I.F. (Sterlin).

Placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano y de fondo en "U" (Costar).

Resina cromatográfica de diaminooetil celulosa (DE 52, Whatman).

3.1.11. Aparataje.

Agitadores (Bunsen)

Autoclave (SELECTA).

Balanzas de precisión (Sauter y Sartorius).

Bombas de filtración (MILLIPORE).

Baño termostático con agitación (Precision Scientific Inc.)

Biofuga (13 Heraeus).

Cámara de flujo laminar (Telstar).

Centrífuga omnífuga refrigerada (2.0 RS Heraeus).

Centrífuga de alta velocidad (RCSC Sorvall Ints., Du Pont).

Citómetro de flujo FACscan (Becton Dickinson).

Citocentrífuga (Shandon).

Congelador de -70°C (Heraeus).

Contador de centelleo beta (LKB).

Contador de contolloo gamma (LKB).
Destilador de agua ultrapura (ELGA).
Espectrofotómetro (1201 Milton Roy Spectronics).
Homogeinizador manual (Pobell)
Incubador termostalizado (Kowall y Heraeus).
Incubadores termostalizado y con atmósfera de CO₂ controlada (PACISA y SELECTA).
Lector de placas de ELISA (SLT LabInstruments).
Medidor de pH (D-501 Crison Inc.).
Microscopios ópticos (Nikon).
Microscopio óptico invertido (Pleuger)
Pipetas automáticas y multidisponsadoras (Gilson y Menarini)
Recolector de células (Taller de Ayuda a la Investigación, UCM)
Sonicador (Vibra Cell Sonics Materials)

3.2. METODOS

3.2.1. Dilución de los neuropéptidos.

Las diferentes diluciones de los neuropéptidos (Bombesina, GRP y Neuromedina C) se realizaron en solución PBS o en medio Hank's, cada día de experimentación de modo que se obtubieran las concentraciones deseadas en cada ensayo.

3.2.2. Obtención de muestras celulares.

3.2.2.1. Obtención de macrófagos peritoneales murinos.

Los macrófagos fueron obtenidos del peritoneo de ratones sacrificados por dislocación cervical, que fueron manipulados en todo momento en condiciones de esterilidad. La piel sobre el abdomen se retra, quedando al descubierto, pero sin abrir, la cavidad peritoneal en la que se inyectan a continuación 4ml de medio de cultivo Hank's a 36°C y tras suave masaje abdominal, se recupera el 90% de la suspensión inyectada. Esta suspensión peritoneal se encuentra fundamentalmente constituida por linfocitos y macrófagos, (en proporción de 2:3), células que son contabilizadas por ml

de suspensión, utilizando una cámara de Neubauer y microscopio de contraste de fase. Los macrófagos se diferencian por su morfología y por tinción esterasa no específica.

Purificación de macrófagos peritoneales murinos. Aliquotas de 500 μ l de la suspensión peritoneal se mantienen en tubos eppendorf, o bien 200 μ l en placas MIF, dependiendo del ensayo a realizar posteriormente con estas células, durante 45 min a 37°C para permitir la adhesión de las células a las paredes del tubo o a la superficie de la placa, se decanta el sobrenadante (que incluye células no adherentes, linfocitos T principalmente) y se añade tripsina al 0,5% incubándose durante 1 hora para eliminar los linfocitos adheridos (fundamentalmente células B). Se lava con PBS y se incuban las células adheridas con medio de cultivo RPMI durante 24 h para facilitar la recuperación de los receptores en los macrófagos.

3.2.2.2. Obtención de leucocitos de órganos linfoides.

Los órganos inmunocompetentes que van a ser utilizados en los ensayos: bazo, timo y ganglios axilares, fueron extraídos, en condiciones de esterilidad, del ratón, previamente sacrificado por dislocación cervical. Los órganos así obtenidos, fueron cuidadosamente macerados en medio de cultivo RPMI completo (suplementado con 10% de SFT descomplementarizado) y filtrados por una malla. Los leucocitos de bazo fueron separados siguiendo la técnica de Boyüm (1968) que consiste en la centrifugación de la suspensión celular en un gradiente de Ficoll de densidad 1070 a 2500 rpm durante 25 min. Los hematíes quedan depositados en el fondo del tubo, el plasma, en la parte superior y en la interfase ficoll-plasma se localiza el hato de leucocitos, que es extraído y lavado tres veces con PBS por centrifugación a 1200 rpm. Los leucocitos de timo y ganglios se lavaron con PBS a 1200 rpm tras ser filtrados por la malla. Las células así obtenidas se contabilizan en cámara de Neubauer.

Purificación de linfocitos T.

La suspensión de leucocitos que se desea purificar se hace pasar a través de columnas empaquetadas con lana de nylon. Se utilizan jeringuillas de 5 ml que se rellenan con 0,6 gr de lana de nylon y que son lavadas con medio RPMI y a continuación con el mismo medio RPMI pero completo y son mantenidas a 37°C y 5%

de CO₂ hasta su utilización. La suspensión celular resuspendida en medio completo se deposita en la columna y se incuba a 37°C durante 30 min, transcurrido ese tiempo se extraen los linfocitos con 5-10 ml de medio completo. La pureza en linfocitos T así obtenida es del 97%, según fue comprobado por inmunodetección utilizando un anticuerpo anti-Thy1. Para ello se citocentrifugaron 200 µl de la suspensión celular purificada y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido este tiempo las preparaciones se fijaron con acetona durante 10 min y se dejaron secar 20 min. Se bloqueó la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno en proporción 99:1 durante 30 min. A continuación se añadió suero de conejo (dilución 1:30 en PBS/BSA), animal en el que estaba obtenida la segunda capa y se esperó 20 min para añadir el anticuerpo antiThy1⁺ (sobrenadante concentrado). Se dejaron algunas preparaciones sin esta primera capa como controles positivos. Se lavó tres veces con PBS y se añadió la segunda capa, inmunoglobulina anti ratón obtenida en conejo (dilución 1:20 en PBS/BSA + 1% suero de ratón). Se volvió a lavar y se adicionó el complejo PAP (dilución 1:30 en Tris + 1% suero de ratón). Se reveló con DAB, se realizó una tinción de contraste con azul de metileno, se desengrasó y se montaron las preparaciones para observarlas al microscopio.

3.2.3. Viabilidad celular.

La viabilidad de las células extraídas y utilizadas en las distintas técnicas fue analizada mediante el método de exclusión del colorante vital tripan azul. Este colorante al 0,5% en solución salina se añade a la suspensión celular (al 50% en volumen) y se contabilizan inmediatamente en cámara de Neubauer las células que aparecen teñidas de azul (muertas) y las que no lo están (vivas), expresándose como porcentaje de mortalidad o viabilidad. Solamente se utilizaron para efectuar los correspondientes experimentos aquellas suspensiones celulares que presentaban una viabilidad mayor del 95%.

3.2.4. Estudio del proceso fagocítico.

La función fagocítica en el macrófago conlleva una serie de acciones que se desarrollan con anterioridad al proceso de ingestión del material extraño y que se continúan tras el mismo. En primer lugar el macrófago peritoneal se adhiere al sustrato

tisular, posteriormente se mueve hacia el foco de infección dirigido por un gradiente de productos atrayentes (quimiotaxis). Ya en contacto con el material extraño se une a él espontáneamente o a través de factores séricos, y lo ingiere. Por último el material ingerido es destruido y digerido mediante un proceso que requiere actividad metabólica oxidativa. Pasamos a analizar la metodología utilizada para el estudio de cada uno de estos procesos en el macrófago peritoneal murino.

Los macrófagos en la suspensión celular obtenida del peritoneo se ajustan a 5×10^5 macrófagos/ml de medio Hank's para llevar a cabo el estudio de las diferentes etapas del proceso fagocítico.

Las concentraciones de los neuropéptidos utilizadas van desde 10^{-14} hasta 10^{-6} M en intervalos de una decena molar.

3.2.4.1. Adherencia a sustrato

La capacidad de adherencia al sustrato del macrófago se analizó siguiendo la técnica previamente descrita por nuestro grupo (De la Fuente y cols, 1990). Brevemente consiste en dispensar alícuotas de 200 μ l de la suspensión peritoneal ajustada en tubos eppendorf, a los que se añadió 20 μ l de cada uno de los neuropéptidos para obtener las diferentes concentraciones indicadas anteriormente. Los controles recibieron 20 μ l de medio Hank's. A los 5, 10, 20, 30 o 60 min de incubación en estufa a 37°C, se tomaron alícuotas de 10 μ l y se cuantificó en cámara de Neubauer el número de macrófagos no adheridos, calculándose el índice de adherencia (I.A.) como sigue:

$$(IA) = 100 - \left(\frac{\text{macrófagos/ml del sobrenadante}}{\text{macrófagos/ml de la suspensión original}} \right) \times 100$$

3.2.4.2. Movilidad inducida (Quimiotaxis)

La movilidad inducida o quimiotaxis, se evaluó según una modificación de la técnica original descrita por Boyden (1962), que consiste básicamente en la utilización de cámaras con dos compartimentos separados por un filtro de nitrocelulosa (MILLIPORE) de 3 μ m de poro. Se depositan alícuotas de 300 μ l de la suspensión de macrófagos ya ajustada en el compartimento superior de la cámara junto con 30 μ l de la dilución del neuropéptido, para obtener las diferentes concentraciones, o 30 μ l de medio Hank's

on las muestras controles. En la parte inferior se depositan alicuotas de 400 μ l de F-Met-Leu-Phe a la concentración de 10^{-8} M utilizado como agente quimiotáctico.

Las cámaras se incuban durante 3 horas a 37°C en una atmósfera al 5% en CO₂ y con humedad a saturación. Trás la incubación los filtros son recuperados, fijados y teñidos siguiendo las siguientes pautas:

Alcohol metílico 50%	5min
Alcohol etílico 75%	5min
Agua destilada	2min
Eosina-azul de metileno.....	15min
Agua destilada	2min

Posteriormente se procede al recuento al microscopio del número de macrófagos que aparecen en la cara inferior del filtro, mediante cuatro barridos de 5 mm cada uno, con lo que se cubre aproximadamente un tercio de la superficie total del filtro. El valor obtenido en dicho recuento lo denominamos índice quimiotáctico (IQ).

3.2.4.3. Capacidad quimioatrayente

Así mismo, también se valoró la capacidad quimioatrayente de los péptidos utilizando las mismas cámaras pero modificando la técnica, de forma que los neuropéptidos se dispensan, a las diferentes concentraciones, en el compartimento inferior de la cámara de Boyden y las células en el superior. El control lleva péptido formilado: F-Met-Leu-Phe a la concentración de 10^{-8} M como quimioatrayente, en el compartimento inferior.

3.2.4.4. Fagocitosis de *Cándida albicans*.

Las placas con el medio de cultivo de *C.albicans* descrito en materiales, se siembran en condiciones de esterilidad y se mantienen en estufa a 37°C durante un máximo de 4-5 días.

3.2.4.4.1. En tubo. Se llevo a cabo siguiendo la técnica descrita por Bruno y cols. (1973) ligeramente modificada por Nuñez y cols.(1989). Alicuotas de 500 μ l de la solución de macrófagos se dispensan en tubos de plástico junto con 500 μ l de *C.albicans* ajustadas a 5×10^6 células/ ml de medio (relación macrófagos/ cándidas 1/10) y 40 μ l de un pool de suero humano, como fuente de opsoninas, o en su lugar

40 μ l de medio para evaluar la fagocitosis espontánea. Se añade seguidamente el neuropéptido a las diferentes concentraciones o bien medio de cultivo en igual cantidad, 10 μ l, en las muestras controles.

Tras incubación durante 60 min a 37°C, se centrifuga a 800 g durante 10 min. Se eliminan 2/3 del sobrenadante y se agita vigorosamente el resto, efectuándose seguidamente el recuento en cámara de Neubauer y expresando los resultados como número de candidas ingeridas por 100 macrófagos.

3.2.4.4.2. En placa MIF. Se siguió una técnica diseñada por nosotros tomando como base otra previamente descrita (De la Fuente, 1985). Alícuotas de 200 μ l de la suspensión original de macrófagos se incuban en cada pocillo de placas MIF durante 30 minutos a 37°C. Al mismo tiempo son incubadas *C. albicans*, ajustadas a 10×10^6 células/ml de medio (relación: macrófagos/ candidas 1/20), con suero (la relación candidas/ suero en volumen fue de 200 μ l/ 40 μ l). La monocapa de macrófagos adherida a la placa, se lava con medio salino PBS a 37°C. Seguidamente se añade a cada pocillo alícuotas de 200 μ l de candidas y suero, e inmediatamente 20 μ l del neuropéptido para conseguir las diferentes concentraciones o 20 μ l de medio Hank's en los controles. Transcurridos 60 minutos de incubación en estufa a 37°C, las placas se lavan con abundante PBS a esa misma temperatura, para eliminar las candidas no fagocitadas. Las placas se fijan en metanol durante 5 min. y se tifen con un Wright-Giemsa modificado (DIFF-QUICK) procediéndose al recuento del número de candidas ingeridas por 100 macrófagos, lo que se indica como índice de fagocitosis (IF).

3.2.4.5. Fagocitosis de partículas inertes (bolas de latex)

Se siguió la técnica descrita por De la Fuente (1985). Se añaden alícuotas de 200 μ l de la suspensión peritoneal ajustada a placas de MIF y se obtienen la monocapa como se indicó en el apartado anterior de fagocitosis de candidas en placas MIF. En este caso una vez lavada la monocapa de macrófagos, se añade a cada pocillo 200 μ l de medio Hank's, 20 μ l de latex (al 1% en PBS) y 20 μ l de los neuropéptidos para conseguir las diferentes concentraciones o únicamente de medio en los controles. Se incuban las placas 30 min, se lavan, fijan y tifen. Se cuentan el número de partículas de latex ingeridas por 100 macrófagos (IF).

Para averiguar el efecto de los neuropéptidos sobre poblaciones purificadas se ensayó esta misma prueba con macrófagos peritoneales que fueron purificados siguiendo el protocolo explicado en el apartado 3.2.2.1. realizado en placas MIF. Procediendo a continuación como en el caso de muestras peritoneales completas que acabamos de describir.

3.2.4.6. Digestion del material fagocitado

A la hora de estudiar el efecto de los péptidos sobre la capacidad de destrucción del material ingerido de los macrófagos, se valoró la producción de dos metabolitos oxidativos: O_2^- y H_2O_2 .

El anión superóxido (O_2^-) se midió gracias a la gran capacidad de éste para reducir compuestos, utilizando nitroazul de tetrazolio (NBT) que es convertido en proporción equimolar en un formazan detectable por espectrofotometría (Bagasra y cols, 1988).

En cuanto al peróxido de hidrógeno lo hemos valorado por citometría de flujo valiéndonos de un compuesto fluorescente, el diacetato de 2,7-diclorodihidro fluoresceína (DDF-DA). Este es un compuesto no fluorescente y estable que atraviesa la membrana celular por su carácter apolar y es desacetilado en el interior de la célula, quedando atrapado y siendo rápidamente oxidado en presencia de H_2O_2 a un compuesto altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína.

3.2.4.6.1. Test de reducción del Nitroazul de tetrazolio (NBT)

Se realizó siguiendo el método descrito por De la Fuente (1985) ligeramente modificado por Nuñez y cols.(1989). A Aliquotas de 250 μ l de la suspensión original de macrófagos, se les añaden 250 μ l de NBT (1 mg/ ml Hank's). Seguidamente se incorporan 50 μ l de la suspensión de latex (al 1 % en PBS) para estudiar la reducción en condiciones de estimulación (muestras estimuladas) o 50 μ l de medio en las muestras sin estimular. Los neuropéptidos se añaden en alícuotas de 50 μ l para obtener las diferentes concentraciones y en los controles se dispensa igual volumen de medio.

Transcurridos 60 minutos de incubación en baño a 37°C y con agitación suave, se para la reacción añadiendo a cada tubo 2,5 ml de CIH 0,5 N, se centrifuga 30 min a 1.600 g, se desprecia el sobrenadante y el NBT reducido es extraído con 1 ml de

dioxano, se centrifuga de nuevo y se determinan las absorbancias del sobrenadante en espectrofotómetro a 525 nm.

Para realizar la curva patrón, se procedió como sigue: se incubaron alícuotas de 500 μ l. de NBT a diferentes concentraciones (desde 10^{-5} M a 10^{-3} M) con ditiotreitól como agente reductor en proporción 1:1 molar, y se siguieron los mismos pasos explicados anteriormente en este mismo apartado.

Una vez dibujada la curva patrón con concentraciones de NBT frente a las absorbancias obtenidas, se interpolaron los valores encontrados en los experimentos con el fin de expresar los resultados en concentración de NBT.

3.2.4.6.2. Estudio de la formación de metabolitos del oxígeno por citometría de flujo.

Se recogen las células peritoneales, se lavan en medio Hank's y se ajustan a 8×10^6 macrófagos/ml. Se vuelven a lavar y el precipitado se resuspende en 1 ml de buffer A (Hank's sin Ca^{2+} , sin Mg^{2+} y con 1 mM EGTA). Se añade diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DDF-DA) de una solución stock de 5 mM en etanol, para dar una concentración final de 5 μ M. Se incuba 15 min a 37°C y se centrifuga a 1000 rpm, 5 min, para eliminar el exceso del producto, y se resuspende de nuevo en 1 ml de buffer A. Se dispensan alícuotas de 100 μ l/tubo en tantos tubos como muestras se vayan a ensayar y se completa a 1 ml con buffer A. Se añaden los estímulos en 10 μ l (PMA 50 ng/ml, FMLP 10^{-6} M y GRP 10^{-10} M). Como control positivo se utiliza 300 μ M de H_2O_2 y como control negativo 5 mM de azida sódica. Se incuban los tubos en baño con agitación durante 15 min a 37°C. Se mantienen en hielo y se analizan en el citómetro de flujo.

3.2.5. Estudio de la función linfóide.

Pasamos a describir la metodología empleada para analizar la quimiotaxis en los linfocitos, así como la capacidad quimioatrayente de los neuropéptidos, y la capacidad proliferativa de células linfoides incubadas con los neuropéptidos. Se ensayaron BN, GRP y neuromedina C a tres concentraciones: 10^{-8} , 10^{-10} y 10^{-12} M.

3.2.5.1. Quimiotaxis y capacidad quimioatrayente.

La quimiotaxis de los linfocitos se valoró siguiendo el mismo método descrito para macrófagos en el apartado 3.2.4.2. con alguna salvedad y es que se utilizó péptido formilado como quimioatrayente.

La capacidad quimioatrayente de los neuropéptidos para los linfocitos se estudio añadiendo en el compartimento inferior de la cámara de Boyden las distintas concentraciones de BN, GRP y neuromedina C, como se describe en el apartado 3.2.4.3.

Se realizaron ambas pruebas con linfocitos peritoneales y de órganos linfoides: timo, bazo y ganglios axilares.

Así mismo, se estudio la quimiotaxis en muestras enriquezidas en linfocitos T de peritoneo y de los tres órganos linfoides. Para ello se procedió a la purificación de las poblaciones de leucocitos, según la metodología descrita en el apartado 3.2.2.2., y a continuación se procedió al ensayo de quimiotaxis de la misma manera que con las muestras completas.

3.2.5.2. Respuesta proliferativa

La respuesta proliferativa de linfocitos fue estudiada mediante un test de transformación linfoblástica (TTL). Su fundamento reside en la capacidad de los linfocitos maduros de transformarse, en condiciones adecuadas, en células con capacidad de división o linfoblastos. Estos linfoblastos sintetizan ADN por lo que añadiendo un precursor de la síntesis, como la timidina, puede cuantificarse el crecimiento.

La suspensión leucocitaria obtenida de ganglios axilares, bazo y timo fue ajustada a 1×10^6 linfocitos/ ml de medio RPMI completo. Para estudiar el efecto de los neuropéptidos sobre la linfoproliferación espontánea, se sembraron alícuotas de 200 μ l en placas de 96 pocillos con fondo plano, en presencia de bombesina, GRP o neuromedina C (10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} M), que fueron incorporados en volúmenes de 20 μ l, o en ausencia de neuropéptidos, en cuyo caso se añadieron 20 μ l de medio únicamente.

Para estudiar la respuesta proliferativa en respuesta a mitógenos se incorporan en

otros pocillos 20 μ l de Con A como estimulador del crecimiento de linfocitos T, o LPS (20 μ l/ pocillo) como mitógeno de linfocitos B. La Con A se utilizó a dos concentraciones 1 μ g/ml y 5 μ g/ml; el LPS a 10 μ g/ml. Así mismo se incubaron otros pocillos con los tres neuropéptidos a las concentraciones indicadas y en presencia de los mitógenos. Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido este tiempo se añadió 0,5 mCi de timidina-³H por pocillo y se prolongó la incubación durante 24 h más. Al término de la misma se recolectaron las células, con un recolector semiautomático, en papeles (MILLIPORE AP-40) que se introducen en viales con 5 ml de líquido de centelleo. La timidina incorporada, se midió en un contador de centelleo- β , obteniéndose las cuentas por minuto (cpm) de cada pocillo.

Los resultados se expresan como porcentajes de estimulación, dando el 100% a las cpm obtenidas en las muestras controles incubadas sin neuropéptido ni mitógenos.

Estas mismas pruebas se realizaron con muestras de poblaciones enriquecidas en linfocitos T. Para ello se purificaron poblaciones de leucocitos obtenidas de timo, bazo y ganglios axilares, según la metodología descrita en el apartado 3.2.2.2., y a continuación se procesaron de la misma manera que las muestras completas.

3.2.6. Estudio de la actividad citotóxica.

La capacidad citotóxica de las células inmunocompetentes, principalmente la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo o ADCC y la llamada citotoxicidad natural o NK, fueron estudiadas en respuesta a la incubación con los neuropéptidos de la familia de la bombesina.

Para ello, se utilizó como célula diana, la línea tumoral humana K562 para los ensayos de ADCC y las células YAC-1, procedentes de un linfoma murino, como dianas de la actividad NK. También se utilizaron en algunos experimentos las células K562 como dianas de citotoxicidad NK. Las dianas fueron almacenadas a -70°C y crecidas en cultivo antes de su utilización. El cultivo se realizó en frascos estériles mantenidos a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo consistía en RPMI completo al que se añadieron 0,1 mg/ml de gentamicina, y era renovado cada dos días. La evolución del cultivo se controlaba periódicamente con el microscopio invertido, comprobando su crecimiento y detectando posibles contaminaciones.

Se siguieron dos técnicas diferentes para valorar estas actividades. Una basada en

el marcaje de las células tumorales con ^{51}Cr y la otra mediante la utilización de un ensayo comercializado (PROMEGA) que se basa en una valoración enzimática.

3.2.6.1. Ensayo de citotoxicidad por Incorporación de ^{51}Cr .

Esta técnica se basa en el marcaje de las células tumorales usadas como dianas con un isótopo radiactivo: ^{51}Cr , que se incorpora al interior de las células. Las células K562 y YAC-1 se lavan con medio de cultivo RPMI completo, se resuspende el precipitado en 100 μl de suero fetal de ternera y 100 μl de ^{51}Cr (0.1 mCi) y se incuban durante 1 h a 37°C agitando varias veces. Después, se lavan tres veces con medio de cultivo y se ajustan a 2.5×10^4 células/ml.

En los ensayos de ADCC las células K562 se incuban durante 15 min con el anticuerpo monoclonal, anti-CD15 (VIM-D5), que reconoce específicamente el hapteno X (lacto-N pentosil fucosa III) que se expresa en las células tumorales K562 (Madljo y cols., 1981). Se utilizaron varias diluciones del mismo: 1:200; 1:500; 1:1000.

Las células efectoras (leucocitos de bazo, ganglio y timo) se ajustan para obtener unas relaciones efectora:diana de 25:1; 50:1; 100:1 para la prueba de NK o 100:1 para el ensayo de ADCC.

Se siembran en placas de 96 pocillos con fondo en "U" los componentes del ensayo (dianas, efectoras y anticuerpo, en los ensayos de ADCC o solamente los dos primeros en los de NK), y se añaden bombesina, GRP y neuromedina C a diferentes concentraciones (10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12}M). Se centrifugan las placas a 250 g 5 min, para favorecer los contactos intercelulares y se incuban a 37°C y 5% CO_2 durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, se centrifugan de nuevo las placas y se recogen 100 μl /pocillo del sobrenadante y se determinan sus cpm en un contador de centelleo (LKB, Upsala, Suecia). El porcentaje de lisis se calcula como sigue:

$$\% \text{ lisis} = (E-S) \times 100 / M$$

E: media de las cpm obtenidas en los pocillos incubados en presencia de las células efectoras.

S: media de las cpm obtenidas en los pocillos controles de lisis espontánea, sombreados solo con dianas.

M: media de las cpm obtenidas en los pocillos controles de liberación total conteniendo células diana y una dilución 1:100 de detergente Triton-X100.

3.2.6.2. Ensayo de citotoxicidad por valoración enzimática.

En cuanto al otro método utilizado en la valoración de la citotoxicidad se trata de un ELISA comercializado por Promega y cuyas líneas generales exponemos aquí.

Se basa en la valoración de la actividad enzimática de la LDH (lactato deshidrogenasa) liberada al sobrenadante por las células lisadas. Esta valoración se lleva a cabo concluidas las 4h de incubación de las dianas con las efectoras que se realiza de igual manera que en la técnica explicada anteriormente, utilizando también placas de 96 pocillos y fondo en "U". El método consiste en ensayar la actividad LDH en los sobrenadantes de los diferentes pocillos, para lo cual se toman 50 μ l/ pocillo a los que se añaden 50 μ l de una mezcla del sustrato de la enzima (Diaforasa, lactato y NAD^+), se incuba 30 min a temperatura ambiente y se leen las absorbancias a 490 nm.

Utilizando este método se valoró el efecto de los neuropéptidos sobre la actividad citotóxica NK y ADCC en muestras de timo, bazo y ganglios axilares en las que se purificó la población de linfocitos no adherentes (siguiendo la metodología expuesta en el apartado 3.2.2.2.). Así mismo se valoró la actividad "NK-like" en muestras de macrófagos purificados del peritoneo en respuesta a los neuropéptidos.

3.2.7. Estudio de la colaboración Intercelular.

Se valora la producción de citocinas por las células inmunes estudiadas incubadas en presencia de BN, GRP y neuromedina C. Se eligieron citocinas claramente implicadas en las funciones estudiadas: la IL-1 y la IL-2, activadoras de la respuesta linfoproliferativa, la última también implicada en citotoxicidad; el factor de fusión de macrófagos (FFM) responsable de la formación de células gigantes multinucleadas (MGC).

3.2.7.1. Efecto de los neuropéptidos sobre la producción de IL-1 por macrófagos.

3.2.7.1.1. Obtención de sobrenadantes con IL-1.

La suspensión peritoneal fue ajustada a 10^6 macrófagos/ ml, sembrados en placas de cultivo de 96 pocillos en alícuotas de 200 μ l/ pocillo, e incubados a 37°C durante 45 min para favorecer la formación de una monocapa y permitirnos eliminar mediante

lavados con PBS las células no adherentes. A continuación se añadieron a los pocillos los neuropéptidos en alícuotas de 20 μ l/ pocillo para conseguir una concentración de 10^{-10} M. También se incorporó Concanavalina A (1 μ g/ ml) como control de la producción de IL-1, y así mismo, a otros pocillos se añadieron la Con A y BN, GRP o neuromodina C. Por último se añadió medio RPMI completo en alícuotas de 200 μ l/ pocillo y se incubaron las placas durante 24 h a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y humedad a saturación. Finalizada la incubación, las placas se centrifugan y los sobrenadantes, libres de células, se almacenan a -20°C hasta su ensayo.

3.2.7.1.2. Valoración de los niveles de IL-1 β .

La determinación de los niveles de IL-1 β en los sobrenadantes se realizó mediante radioinmunoensayo, que se basa en la competición entre el ligando marcado ((¹²⁵I)-IL-1 β) y el ligando nativo que contengan las muestras, por un número limitado de sitios en un anticuerpo específico. La IL-1 β unida al anticuerpo fue separada de la libre con un anticuerpo unido a bolas magnéticas por centrifugación. La fracción marcada unida al anticuerpo fue medida en un contador gamma y se correlacionaron las cuentas obtenidas con concentraciones de IL-1 β , interpolando los valores en una curva estándar. La cantidad mínima de IL-1 β detectable es de 4 pg/ 0,1 ml. El coeficiente de variación interensayo es del 7,4 % y el de variación intraensayo es del 6,4 %.

3.2.7.2. Efecto de los neuropéptidos sobre la producción de IL-2 por linfocitos.

3.2.7.2.1. Obtención de sobrenadantes con IL-2.

Suspensiones de leucocitos de ganglios axilares, bazo y timo fueron ajustados a 10⁶ células/ ml y sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos a los que se incorporaron BN, GRP, o neuromodina C. A otros pocillos se añadió Con A (1 μ g/ ml) como control positivo. Las placas se incubaron durante 48 h con 200 μ l/ pocillo de RPMI completo a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y humedad a saturación. Trás el periodo de incubación las suspensiones fueron centrifugadas y los sobrenadantes, libres de células, se almacenan a -20°C hasta su ensayo.

3.2.7.2.2. Valoración de los niveles de IL-2.

La determinación de los niveles de IL-2 en los sobrenadantes se realizó usando un

ELISA comercial para ratón. Las muestras y los estándares de IL-2 se incorporan a una placa de ensayo adsorbida con un anticuerpo IgG específico contra la IL-2 de ratón. Después de lavar se añade el anticuerpo específico contra la IL-2 conjugado con peroxidasa. Se lava de nuevo y se añade el sustrato del enzima, fenilendiamina, midiéndose la absorbancia a 490 nm. Esta técnica presenta una ventaja frente a los tradicionales bioensayos con líneas celulares IL-2-dependientes, y es que al utilizar un anticuerpo específico contra IL-2 no está sujeta a interferencias por otras citocinas que pueda haber presentes en los sobrenadantes. La cantidad mínima de IL-2 detectable es de 1 U/ml, el coeficiente de variación de precisión intraensayo es de 5,1 %, y el de precisión interensayo es de 7,3 %.

3.2.7.3. Valoración de la producción de FFM.

La producción del factor de fusión de macrófagos (FFM) fue valorada en presencia del GRP. Para ello, se utilizaron placas MIF en las que se depositaron alícuotas de 100 μ l/pocillo de la suspensión peritoneal ajustada a 5×10^5 macrófagos/ml de medio Hank's. Se incubaron 45 min a 37°C y una vez formada la monocapa, se lavó con PBS a 37°C y se añadieron 200 μ l/pocillo de medio RPMI completo. Se incorporaron 20 μ l/pocillo de PHA como control positivo, o de GRP para obtener una concentración de 10^{-10} M, respectivamente. Trás 24 h de incubación, las células se lavan, se fijan en metanol durante 5 min, se tiñen con un Wright-Giemsa, y se procede al recuento de células gigantes con dos o más núcleos por cada cien macrófagos.

3.2.8. Preincubaciones con los neuropéptidos.

Se realizaron pruebas de valoración de la citotoxicidad natural (NK) incubando los leucocitos previamente al ensayo con GRP. Para ello se obtuvieron los leucocitos de timo, bazo y ganglios axilares, se ajustaron a 10^6 células/ml y se sembraron (100 μ l/pocillo) en placas de 96 pocillos y fondo en "U", añadiéndose 10 μ l de GRP para obtener las siguientes concentraciones: 10^{-8} , 10^{-10} y 10^{-12} M. Se incubó la placa a 37°C y 5 % CO₂ durante 1 h, transcurrida la cual, se centrifugó la placa a 250 g durante 5 min y se lavaron los pocillos dos veces con PBS en iguales condiciones de centrifugación. Seguidamente se añadieron 100 μ l/pocillo de las células YAC-1 ajustadas a 10^5 células/ml y 100 μ l/pocillo de RPMI y se procedió siguiendo el

protocolo expuesto en el apartado 3.2.6.2.

3.2.9. Estudio de la especificidad de los efectos.

La especificidad de los efectos de los neuropéptidos en células inmunes fue estudiada mediante dos aproximaciones. En primer lugar utilizando un antagonista del receptor para la bombesina y por otra parte, realizando ensayos de *binding* con bombesina y GRP marcados isotópicamente.

3.2.9.1. Estudios de competencia con un antagonista del receptor para la BN.

El péptido (Leu¹³-y CH₂NH-Leu¹⁴)-BN, es un antagonista del receptor para la bombesina, que se une específica y competitivamente al receptor para la bombesina antagonizando sus efectos en células Swiss 3T3 (Coy y cols., 1988). Fue incluido en varias pruebas representativas: la capacidad quimiotrayente de los neuropéptidos sobre macrófagos y linfocitos peritoneales y la actividad citotóxica NK de leucocitos de timo.

3.2.9.2. Presencia de receptores para BN y GRP en células Inmunocompetentes.

El fundamento del ensayo utilizado para valorar la presencia de receptores específicos para bombesina y GRP en células inmunes radica en la competencia por los sitios de unión que se establece entre neuropéptido marcado con un isótopo radiactivo y neuropéptido sin marcar. El procedimiento, que se detalla a continuación, sigue la técnica de Segura y cols. (1991).

3.2.9.2.1. Determinación de receptores para BN en macrófagos y linfocitos.

La suspensión celular, linfocitos o macrófagos previamente purificados (apartado 3.2.2.), se ajusta a 1.5×10^6 células/ml en buffer Tris-ClH 35 mM, conteniendo NaCl 50 mM y 1.4% de BSA (albumina de suero bovino) y se dispensan en alícuotas de 500 μ l/tubo. A cada tubo se añaden 100 μ l de ¹²⁵I-BN (2000 mCi/ mmol) para obtener una concentración 45 pM y 10 μ l de diferentes concentraciones de bombesina sin marcar: 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} y 10^{-12} M. A otros tubos se añaden las mismas

concentraciones de GRP o Neuromedina C, o un péptido no relacionado como control negativo, el neuropéptido Y (NPY). Aquellos tubos a los que se añade una concentración saturante del péptido sin marcar (10^{-6} M) nos dan el valor de unión no específica (NSB). La unión total nos la dan los tubos que solamente llevan neuropéptido marcado (TB).

Los tubos se incuban a 15°C durante 90 min, tras los cuales se centrifugan, para quedarnos con el péptido marcado unido a las células, y se lavan tres veces. Se mide la radiactividad de los precipitados y se calcula la cantidad de neuropéptido que se une específicamente a las células para cada concentración del mismo. De la representación de Scatchard de los datos así obtenidos, se calcula la afinidad de la unión al receptor, que viene dada por la constante de disociación, K_d y la concentración de sitios de unión.

3.2.9.2.2. Determinación de receptores para GRP en macrófagos y linfocitos.

Se procedió siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente para el caso de la BN. En este caso se incuban las células con una concentración 45 pM de ^{125}I -GRP (2000 mCi/mmol) añadiendo $10\text{ }\mu\text{l}$ de diferentes concentraciones de GRP sin marcar, o de BN o Neuromedina C, o del NPY como control negativo. Se representan gráficamente los datos obtenidos y se calcula la afinidad y la concentración de sitios de unión.

3.2.10. Ensayo de quimiotaxis modificado para la determinación de la presencia de un factor secretado por macrófagos.

Se ensayó el efecto del GRP a la concentración más efectiva, 10^{-10} M, en la quimiotaxis de linfocitos mantenidos en la suspensión peritoneal completa (P.Total) y de linfocitos T purificados del peritoneo (L. purificados) y se ensayó un tercer grupo consistente en linfocitos aislados del peritoneo a los que se añadió el sobrenadante de una suspensión de células adherentes del peritoneo (macrófagos y linfocitos B) o de una suspensión de macrófagos purificados, que fue previamente incubada con GRP (10^{-10} M).

Para ello se separó la suspensión obtenida del peritoneal en dos alícuotas. Se

incubaron 45min a 37°C para obtener la población adherente, se lavó y a una de las alícuotas se añadió tripsina al 0,5% durante 45 min, para purificar los macrófagos, a continuación se lavó y se recuperaron los receptores de los fagocitos durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente ambas alícuotas fueron incubadas con GRP (10⁻¹⁰ M) durante 3 h, lavándose a 1500 rpm 10 min y obteniendo los sobrenadantes. Transcurrido este tiempo se procedió al ensayo de quimiotaxis con una población purificada (como se describe en el apartado 3.2.2.2.) de linfocitos T, a la que se añadieron los sobrenadantes obtenidos de las muestras purificadas de macrófagos, o de las muestras de células adherentes (macrófagos y linfocitos B).

3.2.11. Estudio del mecanismo de acción de los neuropéptidos.

Para estudiar los mecanismos intracelulares implicados en la transmisión de la señal de estos neuropéptidos valoramos los niveles intracelulares de segundos mensajeros implicados en las principales rutas de transducción de señales: AMPc, IP₃ y proteína quinasa C (PKC)

3.2.11.1. Valoración de AMPc.

3.2.11.1.1. Procesamiento de las muestras celulares.

Sobre alícuotas de 500 µl/ tubo eppendorf de macrófagos peritoneales purificados (protocolo de purificación descrito en el apartado 3.2.2.1.) o de linfocitos purificados de ganglios axilares (apartado 3.2.2.2.) se añaden alícuotas de 5 µl de los neuropéptidos a las diferentes concentraciones utilizadas (10⁻⁹, 10⁻¹⁰ y 10⁻¹¹ M), junto con un inhibidor de fosfatasa, Isobutil-metil-xantina (IBMX) 0,2 mM, y a distintos tiempos (30, 60 y 120 segundos) se para la reacción con 500 µl/ tubo de ácido trifluoracético 1N. Los tubos se agitan enérgicamente y se congelan hasta la realización del radioinmunoensayo.

3.2.11.1.2. Cuantificación de AMPc

El ensayo para la cuantificación de AMPc se basa en la competencia entre una cantidad fija de AMPc marcado radiactivamente con ¹²⁵I y el AMPc contenido en la suspensión celular que se analiza, por un número limitado de sitios de unión en un anticuerpo específico. Con cantidades fijas de anticuerpo y ligando radiactivo, la cantidad de este ligado al anticuerpo será inversamente proporcional a la concentración del ligando no radiactivo añadido. El AMPc ligado al anticuerpo es entonces precipitado

con un segundo anticuerpo unido a partículas poliméricas separables magnéticamente.

La curva patrón se realiza con siete concentraciones de AMPc, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 fmol. Para conseguir una mayor sensibilidad se procedió a la acetilación previa de la curva patrón y de las muestras problema. La sensibilidad del ensayo es de 1 fmol, y la reproducibilidad interensayo es del 5,8 % y el coeficiente intraensayo del 4%.

Representando gráficamente los valores obtenidos con las concentraciones de AMPc estándar construimos la curva patrón. Sobre ella se interpolan los valores obtenidos para las muestras y se leen las concentraciones de AMPc / tubo. Los resultados se expresan como pmoles de AMPc / 10^8 células.

3.2.11.2. Valoración de inositol trifosfato (IP_3).

3.2.11.2.1. Procesamiento de las muestras celulares.

Se procedió igual que para la valoración de los niveles intracelulares de AMPc. Con la diferencia de que no se añadió el inhibidor de fosfatasas (IBMX) y las muestras celulares se incubaron en medio 199, en lugar de en RPMI, porque este medio presenta los niveles de inositol más bajos entre los medios comerciales, siendo el más utilizado para la valoración de este segundo mensajero.

3.2.11.2.2. Cuantificación de IP_3 .

El método utiliza IP_3 marcado con tritio y una proteína bovina adrenal que se une específicamente al IP_3 . El ensayo se basa en la competición entre el IP_3 marcado y el IP_3 presente en la muestra por un número limitado de sitios en la proteína de unión. Con concentraciones conocidas de la proteína de unión y el ligando radiactivo, la cantidad de éste último que se une a la proteína es inversamente proporcional a la cantidad de IP_3 de la muestra añadida. El IP_3 unido se separa del libre por centrifugación, y se mide la radiactividad en los precipitados, determinando las concentraciones de IP_3 en las muestras por interpolación en una curva de estándares. La curva patrón se realiza con ocho concentraciones de IP_3 , 0,19, 0,38, 0,76, 1,5, 3,1, 6,2, 12,5 y 25 pmol/ tubo que constituyen las muestras estándares.

Los resultados se expresan como pmoles de IP_3 por 10^8 células. La cantidad de IP_3 detectable se encuentra entre 0,19-25 pmol/ tubo, el coeficiente de variación

intraensayo es del 12,5 %, y el de interensayo es del 8,2 %.

3.2.11.3. Ensayo de la actividad proteina kinasa C.

La actividad de la proteina quinasa C en células inmunocompetentes (macrófagos y linfocitos) se valora cuantificando la fosforilación de histona con ^{32}P -ATP que lleva a cabo la PKC aislada previamente de dichas células.

3.2.11.3.1. Activación y purificación del enzima.

Alícuotas de 500 μl de las células inmunes, linfocitos o macrófagos, ajustados, respectivamente, a 10^7 y a 5×10^6 células/ml, fueron incubadas durante 5 min a 37°C con diferentes concentraciones de los neuropéptidos (10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} M), y varios controles, como el forbol miristato acetato (PMA) potente activador de la PKC, a una concentración de 50 ng/ml, retinal, un inhibidor del anterior, a una concentración 20 mM y Con A $1\mu\text{g/ml}$. La incubación se para con solución de PBS muy fría e inmediatamente se centrifugan las muestras dos veces. En este punto las muestras se pueden almacenar a -70°C o proseguir con el ensayo.

Las células se resuspenden en 1ml de buffer (A) de homogenización (20 mM HEPES, pH 7.5; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 10 mM 2-mercaptoetanol; 1mM aprotinina (trasilol); 1mM PMSF; 10mg/ml leupeptina) y se centrifugan a 20.000 rpm durante 30 min a 4°C . Los precipitados se resuspenden en 2 ml de buffer A con 0.1% de triton X-100 y se sonicán en tres pulsos de 5 seg. Las dos fracciones correspondientes a citosol (sobrenadantes) y membranas (precipitados) se purifican en columnas de intercambio iónico, preparadas previamente con 0.5 ml de resina DE-52 equilibrada con buffer B (10 mM HEPES, pH 7.5; 0.2 mM EDTA; 0.2 mM EGTA; 2-mercaptoetanol 10 mM; NaCl 20 mM), y se eluye la PKC, usando un gradiente de 0 a 0.25 mM de NaCl. Este paso se realiza a 4°C en cámara fría.

3.2.11.3.2. Ensayo enzimático.

Seguendo el método de Gopalakrishna y cols. (1986), alícuotas de 100 μl de muestra de cada fracción fueron incubadas a 30°C durante 5 min con 20 mM HEPES (pH 7.4); 2-mercaptoetanol 5 mM; histona 35 mg/ml; 0.2 mM ATP y 0.1 mCi/tubo de ^{32}P ATP en presencia o en ausencia de extracto de cerebro 2 mg/ml (como fuente de fosfatidilserina) y 2 mM CaCl_2 . La reacción se paró con 1ml/ tubo de ácido tricloroacético

al 25%. El precipitado se recogió por filtración en papel Whatman GF/C y se midió la radiactividad (LKB β -counter). La actividad PKC se calcula como la cantidad de ^{32}P incorporado a la histona, en presencia de fosfatidilserina y calcio, menos la cantidad incorporada en su ausencia. Estos valores se expresan en el apartado de resultados como fósforo incorporado en histona por 10^6 células y por minuto.

3.2.7. Estudio estadístico.

Los resultados se expresan mediante la media aritmética y desviación estandar de los datos obtenidos en cada una de las diferentes pruebas.

La normalidad de la distribución de las variables se analizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se evaluaron mediante un test ANOVA de mediantes repetidas. La comparación de las muestras apareadas entre sí se analizó mediante una t de Student.

Se consideró que no había significación cuando el valor de la probabilidad (p) fue mayor de 0,05. Una diferencia de $p < 0,05$ ha sido considerada como significativa, de $p < 0,01$ como muy significativa y de $p < 0,001$ como altamente significativa.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

En primer lugar se exponen los resultados obtenidos en cuanto al efecto de cada uno de los tres neuropéptidos estudiados: bombesina, GRP y neuromedina C, sobre el proceso fagocítico de macrófagos peritoneales murinos, en todas y cada una de sus diferentes etapas. En segundo lugar, se presentan los resultados correspondientes al efecto de los neuropéptidos sobre la funcionalidad del linfocito, representada por la proliferación y quimiotaxis. En tercer lugar, se muestran los resultados obtenidos en cuanto al efecto sobre la actividad citotóxica natural y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. En cuarto lugar, los resultados en relación al efecto de estos neuropéptidos sobre la secreción de factores de colaboración intercelular. A continuación, se muestran los resultados obtenidos cuando se procedió a una incubación, previa a los ensayos, con los neuropéptidos, para averiguar si era necesaria su presencia a lo largo de la prueba. En sexto lugar, se presentan los resultados en cuanto a la especificidad de los efectos observados que incluyen la determinación de la existencia de receptores específicos en las células inmunes. En séptimo lugar, se muestran los resultados obtenidos tras purificar las diferentes subpoblaciones celulares y estudiar el efecto de los neuropéptidos sobre su funcionalidad. A continuación, se muestran los resultados correspondientes al estudio de la mediación por las células adherentes del efecto de los neuropéptidos sobre los linfocitos, y la determinación de la secreción de uno o varios factores que median esta respuesta. Por último se procede a la exposición de los resultados obtenidos en la valoración del mecanismo de acción intracelular de estos neuropéptidos en las células inmunes estudiadas.

4.1. Efecto comparado de bombesina, GRP y neuromedina C sobre el proceso fagocítico de macrófagos peritoneales murinos.

Seguidamente se exponen los resultados correspondientes al estudio del efecto que los neuropéptidos: BN, GRP y neuromedina C, tienen en cada una de las etapas del proceso fagocítico, las cuales se irán exponiendo en el mismo orden en el que tienen lugar *in vivo*: adherencia a sustrato, movilidad dirigida o quimiotaxis, así como capacidad quimioatrayente, ingestión de partículas inertes o de células y mecanismo de destrucción de las mismas.

4.1.1. Adherencia a sustrato.

En la fig 1 se representan los índices de adherencia correspondientes a los resultados obtenidos con macrófagos peritoneales incubados durante 5 min, con cada uno de los tres péptidos estudiados a las concentraciones indicadas (10^{-12} a 10^{-6} M), siendo el 0 el valor control. Del mismo modo se exponen los resultados obtenidos con los otros tiempos de incubación: 10, 20, 30 y 60 min en la tabla 1.

Como se observa en los resultados expuestos, los neuropéptidos estimulan significativamente la capacidad de adherencia de los macrófagos a sustrato prácticamente con todas las concentraciones estudiadas, con excepción de la de 10^{-6} M y a todos los tiempos de incubación analizados.

Se observa un incremento de la adherencia en los macrófagos incubados con neuropéptidos a concentraciones de 10^{-9} y 10^{-10} M a todos los tiempos. La concentración de 10^{-6} M no tiene efecto y los encontrados con 10^{-7} y 10^{-12} M son escasos. Los incrementos mayores se dan a los 10 min de incubación y los menores a los 60 min.

De los resultados que se muestran, se deduce que no existen diferencias significativas entre los tres neuropéptidos en cuanto a su capacidad de estimulación de esta propiedad, salvo a los 5 min de incubación (fig 1), tiempo al que el GRP y la neuromedina C producen un índice de adherencia significativamente mayor ($p < 0,001$) con la concentración de 10^{-11} M con respecto a la BN.

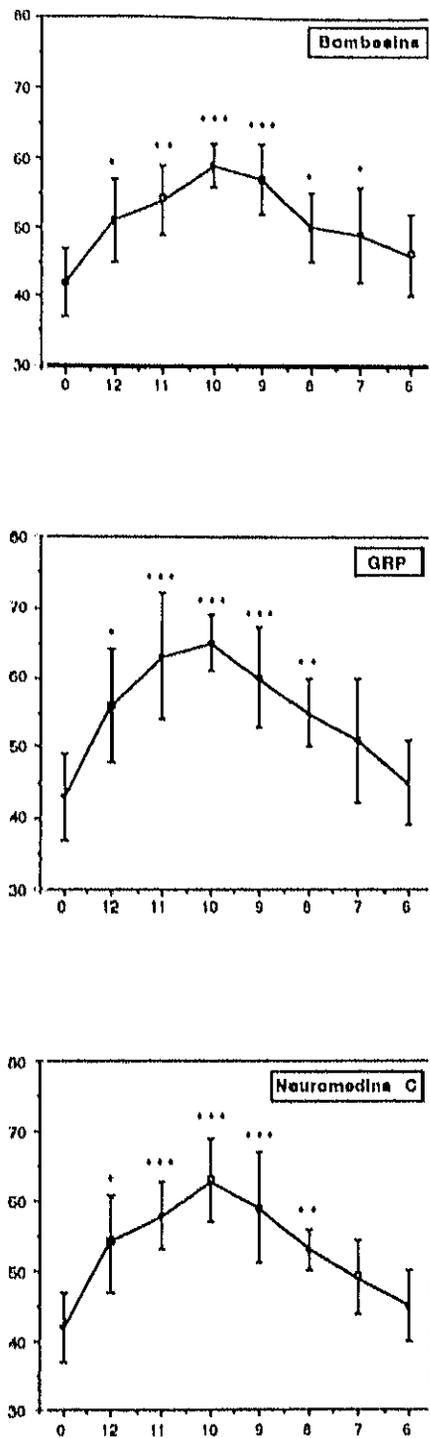


Fig 1. Índices de adherencia (IA) de macrófagos peritoneales murinos incubados durante 5 min con BN, GRP o neuromedina C en el rango de concentraciones que se indica de 10^{-12} a 10^{-6} M. El 0 es el valor control. Se representa la media \pm D.E. de los I.A. de 8 experimentos por duplicado. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

TABLA 1. Índices de adherencia a sustrato de macrófagos peritoneales incubados con bombosina, GRP o neuromedina C.

T incubación (min)	BN				Concentración (M)			
	0	10 ⁻¹²	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
10	52 ± 2	63 ± 7 ^C	67 ± 7 ^a	76 ± 4 ^a	72 ± 5 ^a	67 ± 3 ^b	63 ± 3	58 ± 2
20	62 ± 4	66 ± 5	68 ± 2 ^b	78 ± 2 ^a	76 ± 5 ^a	73 ± 4 ^C	74 ± 4	71 ± 3
30	68 ± 2	71 ± 2	74 ± 2 ^b	81 ± 2 ^a	79 ± 3 ^a	78 ± 4 ^C	79 ± 4	78 ± 4
60	73 ± 5	74 ± 5	77 ± 6	86 ± 3 ^b	84 ± 3 ^b	85 ± 4	84 ± 5	83 ± 3

T incubación (min)	GRP				Concentración (M)			
	0	10 ⁻¹²	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
10	54 ± 4	62 ± 5 ^C	71 ± 4 ^a	77 ± 3 ^a	75 ± 7 ^a	67 ± 7 ^b	63 ± 7	60 ± 7
20	61 ± 5	64 ± 4	74 ± 7 ^b	80 ± 2 ^a	78 ± 7 ^a	71 ± 8 ^C	68 ± 8	66 ± 8
30	68 ± 6	72 ± 3	77 ± 4 ^b	83 ± 3 ^a	82 ± 3 ^a	76 ± 5 ^C	72 ± 6	69 ± 7
60	75 ± 5	75 ± 5	78 ± 5	83 ± 4 ^b	83 ± 4 ^b	81 ± 7	80 ± 4	79 ± 4

T incubación (min)	NC				Concentración (M)			
	0	10 ⁻¹²	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
10	54 ± 7	63 ± 6 ^C	69 ± 7 ^a	77 ± 5 ^a	71 ± 5 ^a	67 ± 6 ^b	63 ± 5	59 ± 6
20	61 ± 7	65 ± 5	71 ± 5 ^b	78 ± 7 ^a	76 ± 6 ^a	71 ± 6 ^C	68 ± 7	64 ± 4
30	68 ± 7	72 ± 4	77 ± 6 ^b	81 ± 5 ^a	80 ± 4 ^a	76 ± 5 ^C	74 ± 5	70 ± 6
60	76 ± 6	78 ± 8	81 ± 5	90 ± 9 ^b	89 ± 6 ^b	84 ± 8	82 ± 6	79 ± 6

Cada valor es la media ± D.E. de 8 experimentos realizados por duplicado. ^C p < 0.05, ^b p < 0.01, ^a p < 0.001 con respecto a controles.

4.1.2. Quimiotaxis

En la fig 2 se representan los índices de quimiotaxis (I.Q.), es decir el número de macrófagos peritoneales murinos contados por filtro, en muestras que fueron incubados durante tres horas con las concentraciones de neuropéptidos que se indican (10^{-14} a 10^{-6} M). El 0 corresponde a las muestras control incubadas en ausencia de neuropéptidos.

Esta capacidad de los macrófagos se encuentra significativamente estimulada por casi todas las concentraciones empleadas de los neuropéptidos, salvo la de 10^{-14} M.

Como puede observarse los valores son significativamente mayores con GRP y con neuromodina C que con bombesina. Existen diferencias significativas entre los valores obtenidos con bombesina y con GRP a las concentraciones de 10^{-14} a 10^{-11} M, y lo mismo ocurre con la neuromodina C a concentraciones de 10^{-13} a 10^{-11} M. A las concentraciones de 10^{-12} y 10^{-11} se dan las mayores diferencias con la bombesina ($p < 0,001$).

4.1.3. Capacidad quimioatrayente.

En la fig 3 se representan los resultados obtenidos en el estudio de la capacidad quimioatrayente de los neuropéptidos a concentraciones de 10^{-12} , 10^{-10} y 10^{-8} M. El 0 es el valor correspondiente al control sin neuropéptido.

Los tres neuropéptidos produjeron un incremento del número de células que migraron a través del filtro. Como se puede observar, el GRP se mostró como el más quimioatrayente de los tres péptidos, siendo la concentración de 10^{-10} M la más efectiva ($p < 0,01$).

Una vez demostrado la capacidad quimioatrayente del GRP sobre todo a la concentración de 10^{-10} M. Se realizaron unos experimentos añadiendo como control positivo, el péptido formilado FMLP, probado quimioatrayente para macrófagos (Shiffmann y Gallin 1979) a la concentración de 10^{-8} M, en los mismos ensayos se añadió GRP 10^{-10} M en otras cámaras o ambos en la misma cámara.

Con FMLP (10^{-8} M) el número de macrófagos que migraron por filtro, en 7 experimentos realizados por duplicado, fue 1021 ± 150 , inferior al obtenido con GRP (10^{-10} M), que fue de 1526 ± 221 . Y cuando se añadieron ambos péptidos el resultado fue de 1095 ± 167 macrófagos.

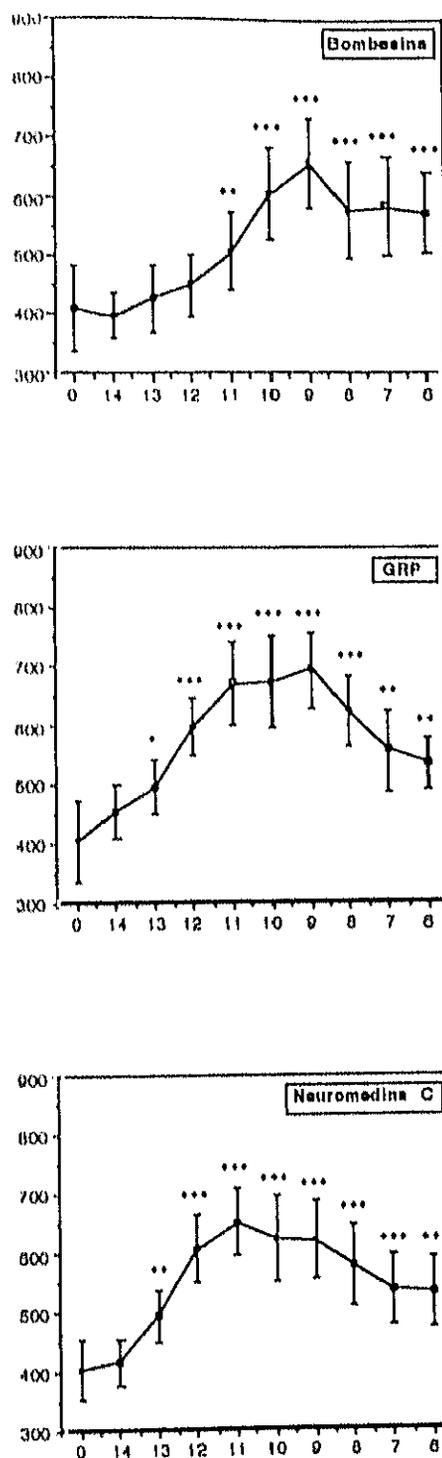


Fig 2. Índices de quimiotaxis (IQ) de macrófagos peritoneales murinos incubados con BN, GRP o neuromedina C en el rango de concentraciones que se indica de 10^{-14} a 10^{-6} M. El 0 es el valor control. Se representa la media \pm D.E. de los IQ. de 8 experimentos por duplicado. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

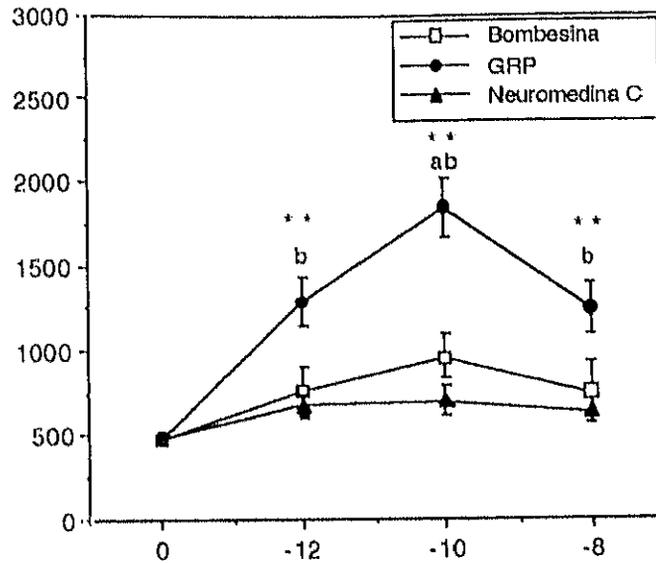


Fig 3. Capacidad quimioatrayente de las concentraciones indicadas (10^{-12} a 10^{-8} M) de bombesina, GRP y neuromedina C para macrófagos peritoneales murinos. Se representan las medias \pm D.E. del número de macrófagos por filtro contados en 5 experimentos por duplicado, frente a concentración de neuropéptidos. ^{**} $p < 0.01$ respecto al control. ^a $p < 0.01$ respecto a BN. ^b $p < 0.01$ respecto a N C.

4.1.4. Capacidad de Ingestión.

Se muestran en primer lugar los resultados correspondientes a la ingesta de partículas inertes. Los valores que se representan en la fig 4 corresponden al número de bolas de latex fagocitadas por 100 macrófagos (I.F.), incubados con las concentraciones que se indican de cada uno de los péptidos ensayados.

No se observan diferencias significativas en ningún caso entre los valores obtenidos con los tres péptidos, estimulando todos ellos la capacidad fagocítica de los macrófagos en concentraciones desde 10^{-8} hasta 10^{-13} M, con valor máximo a la concentración de 10^{-11} M.

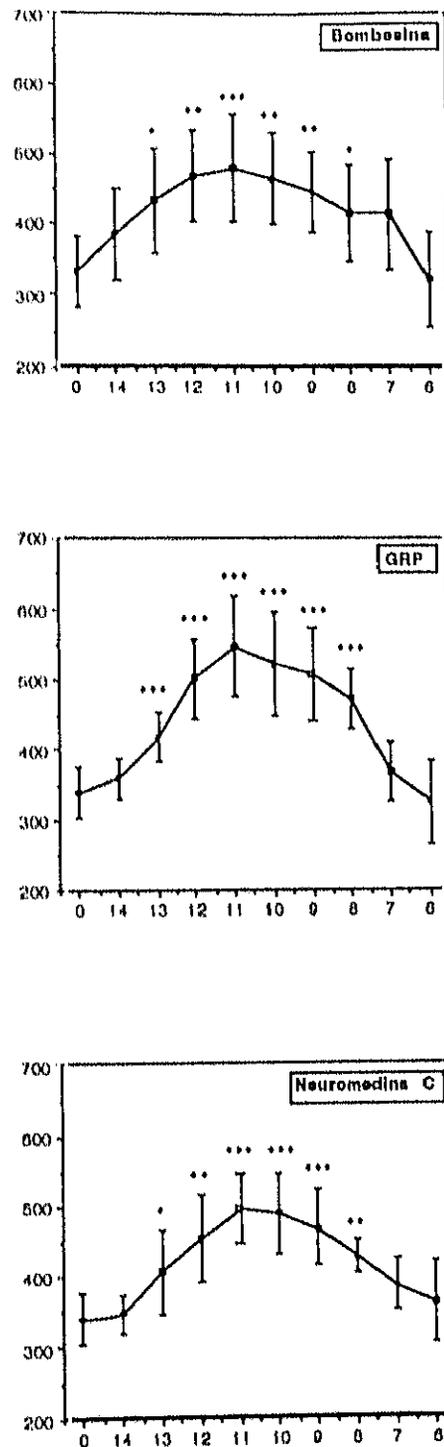


Fig 4. Número de bolas de latex fagocitadas por cten macrófagos (IF) incubados con BN, GRP o neuromedina C a las concentraciones que se indican de 10^{-14} a 10^{-6} M. El 0 es el valor control. Se representa la media \pm D.E. de los I.F. de 8 experimentos por duplicado. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

Los resultados obtenidos en cuanto a la ingestión de *C. albicans*, siguiendo la metodología de fagocitosis en tubo (no mostrados), indican una disminución del número de candidas ingeridas cuando los macrófagos se incuban con los neuropéptidos. Sin embargo, y como se comentará en la discusión, la técnica no resultaba adecuada para este estudio, por lo que pasamos a analizar la propiedad de ingestión en placas de MIF en lugar de hacerlo en tubo.

Los resultados obtenidos utilizando placas de MIF se muestran en la fig 5. Podemos observar un aumento de la fagocitosis de *C. albicans* con los tres neuropéptidos a concentraciones que van desde 10^{-13} a 10^{-8} M, siendo la más efectiva la concentración de 10^{-10} M.

Se observa una estimulación significativamente mayor del GRP y la neuromedina C en comparación con la bombosina en dosis que van desde 10^{-13} a 10^{-11} M. Estas diferencias son altamente significativas ($p < 0,001$) a las concentraciones de 10^{-12} y 10^{-11} M.

4.1.5. Poder de digestión.

Una de las dos metodologías utilizadas para comprobar el efecto de los neuropéptidos sobre el poder de digestión intracelular fue la reducción del nitroazul de tetrazolo (NBT), que como se ha comentado en el capítulo de Métodos, nos da una medida de la cantidad de anión superóxido producido por el macrófago.

Los datos expresados como μ moles de NBT reducido por 10^8 células se indican gráficamente en la fig 6. La transformación de las absorbancias a μ moles de producto se efectuó por interpolación en una curva estándar realizada con las D.O. obtenidas en la reducción de diferentes concentraciones de NBT en la forma que se indicó en la metodología. Los resultados (fig 6) corresponden a los experimentos realizados en ausencia de estímulo fagocítico, muestras no estimuladas, (representados por símbolos abiertos) y en presencia de estímulo fagocítico, partículas de latex, muestras estimuladas (representados por símbolos cerrados).

Se observa una estimulación significativa de la producción de anión superóxido por los macrófagos incubados con los neuropéptidos a concentraciones que van desde 10^{-13} a 10^{-8} M, siendo las concentraciones de 10^{-10} y 10^{-11} M, con las que se consiguió mayor estimulación. No se observan diferencias relevantes entre los efectos producidos por los diferentes péptidos en ningún caso.

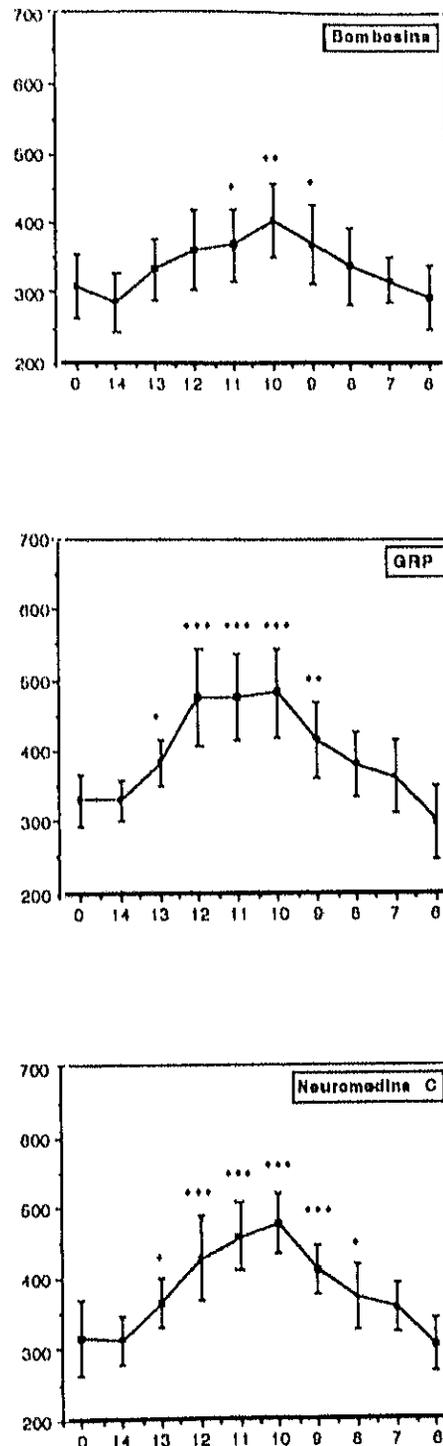


Fig 5. Número de candidas fagocitadas por clen macrófagos (IF) incubados con BN, GRP o neuromedina C a las concentraciones que se indican de 10^{-14} a 10^{-6} M. El 0 es el valor control. Se representa la media \pm D.E. de los I.F. de 8 experimentos por duplicado. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

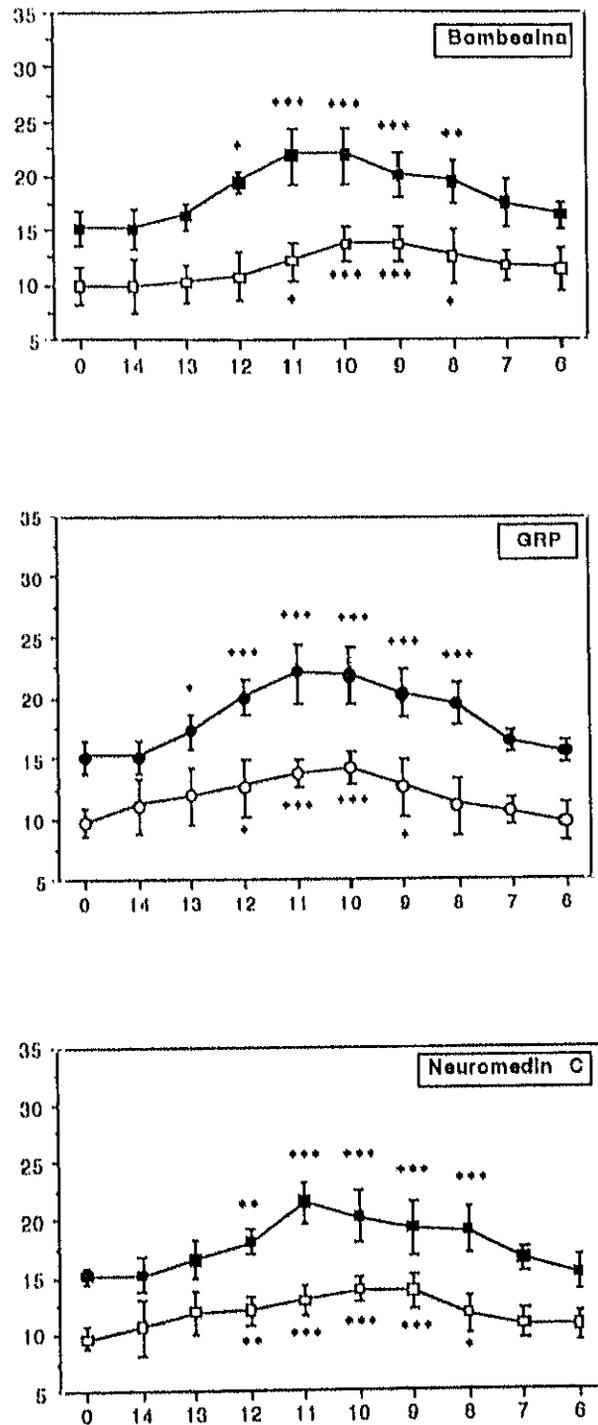


Fig 6. Cantidad de NBT reducido ($\mu\text{moles}/10^8$ células) en macrófagos peritoneales incubados con BN, GRP o neuromedina C a las concentraciones que se indican de 10^{-14} a 10^{-6} M. El 0 es el valor control. Se representa la media \pm D.E. de 8 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

También se valoró la producción de otro radical de oxígeno, el peróxido de hidrógeno mediante citometría de flujo. En la fig 7 se representan los picos de fluorescencia, obtenidos a diferentes tiempos, en muestras de macrófagos peritoneales incubados con diacetato de 2',7'-diclórofluorescina (DCFH-DA).

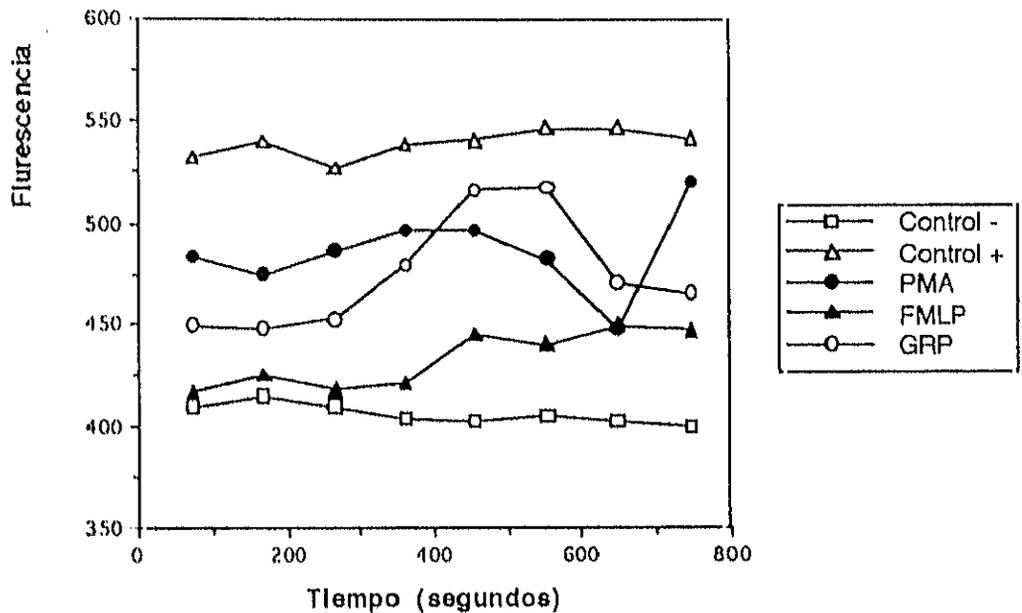


Fig 7. Intensidades de fluorescencia en función del tiempo, de macrófagos peritoneales incubados con GRP 10^{-10} M y con los controles que se indican. Se representa la media de tres experimentos.

Se realizaron varios controles: uno positivo adicionando H_2O_2 a la suspensión celular sin estimular para comprobar que las células habían incorporado suficiente marcador fluorescente; otro negativo con azida sódica que inhibe la glucosa oxidasa y xantina oxidasa que producen metabolitos de oxígeno. Así mismo, se incubaron muestras con PMA y con FMLP además de con el GRP.

Como podemos observar aparece un aumento de fluorescencia con GRP no solo en relación al control negativo sino también en relación a la intensidad producida por el FMLP y a determinados tiempos, a la producida por el PMA.

4.2. Efecto de bombesina, GRP y neuromedina C sobre la funcionalidad de linfocitos murinos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la BN, GRP y neuromedina C sobre la funcionalidad linfóide: la quimiotaxis, así como la capacidad quimioatrayente de los neuropéptidos, y la capacidad proliferativa de células linfoides.

4.2.1. Quimiotaxis.

En primer lugar se muestran los resultados en cuanto al efecto de los péptidos estudiados sobre la capacidad quimiotáctica de linfocitos obtenidos del peritoneo.

En la fig 8, se representan los índices de quimiotaxis (I.Q.) de linfocitos, de muestras peritoneales que fueron incubados durante tres horas con las concentraciones de neuropéptidos que se indican (10^{-12} , 10^{-10} y 10^{-8} M). El 0 corresponde a las muestras control incubadas en ausencia de neuropéptidos.

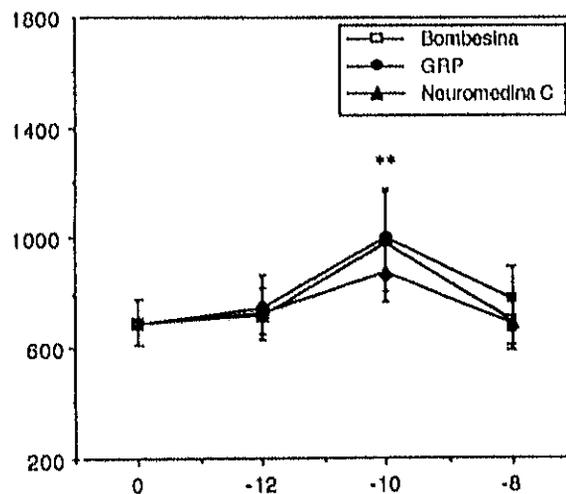


Fig 8. Índices de quimiotaxis (IQ) de linfocitos peritoneales murinos incubados con BN, GRP y neuromedina C con las concentraciones que se indican (10^{-8} - 10^{-12} M). El 0 es el valor control. Se representa la media \pm D.E. de los IQ. de 6 experimentos por duplicado. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

La quimiotaxis en linfocitos peritoneales se encuentra estimulada por los neuropéptidos a la concentración de 10^{-10} M. Como puede observarse los valores son significativamente mayores que en controles con GRP y con bombesina ($p < 0,01$).

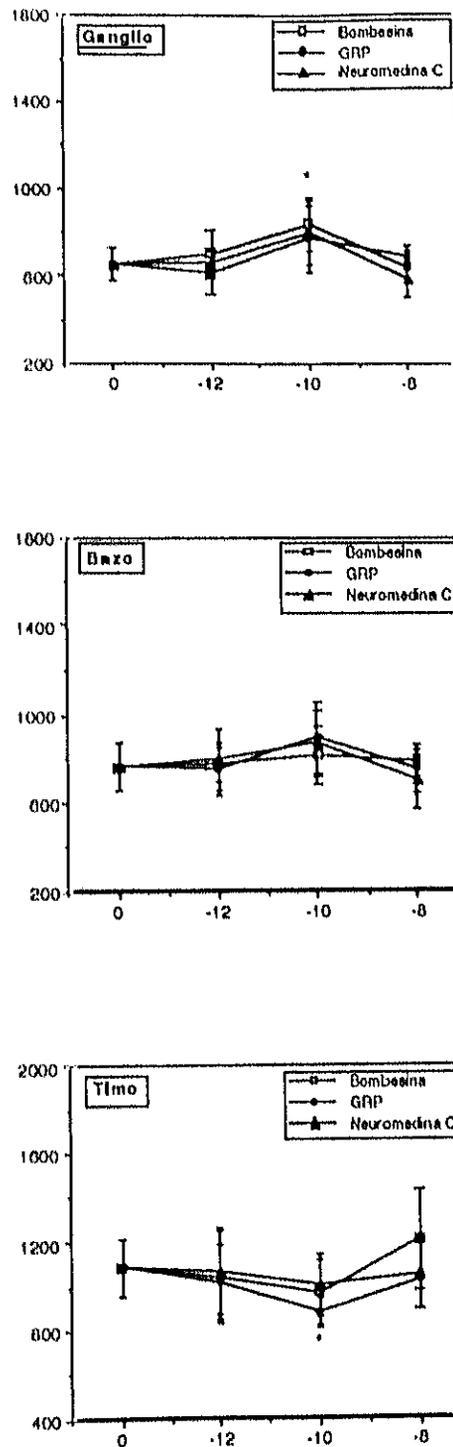


Fig 9. Indices de quimiotaxis (I.Q.) de linfocitos de ganglios axilares, bazo y timo, incubados con BN, GRP o neuromedina C a las concentraciones que se indican (10^{-8} - 10^{-12} M). Se representan la media \pm D.E. de los I.Q. de 6 experimentos por duplicado. * $p < 0.05$.

En la fig 9 se exponen los índices de quimiotaxis de linfocitos obtenidos de bazo, timo y ganglios axilares, incubados con los neuropéptidos durante tres horas. Como se puede observar, existe una ligera estimulación de la quimiotaxis de linfocitos de bazo y ganglios axilares con la concentración de 10^{-10} M, que tiene una significación de $p < 0,05$ en el caso del ganglio, y sin embargo no es estadísticamente significativa en el caso del bazo. En el caso de los linfocitos de timo se observa una ligera inhibición que es significativa ($p < 0,05$) para el GRP a la concentración de 10^{-10} M.

4.2.2. Capacidad quimioatrayente.

En la fig 10 se representan los resultados obtenidos en el estudio de la capacidad quimioatrayente, frente a linfocitos peritoneales, de los neuropéptidos a concentraciones de 10^{-12} , 10^{-10} y 10^{-8} M. El 0 es el valor correspondiente al control.

Como se puede ver, el GRP se mostró como el más quimioatrayente de los tres péptidos, siendo la concentración de 10^{-10} M la más efectiva. Cuando se añadió péptido formilado (FMLP) como control se obtuvo un valor de 681 ± 79 , menor al valor alcanzado con GRP (938 ± 159).

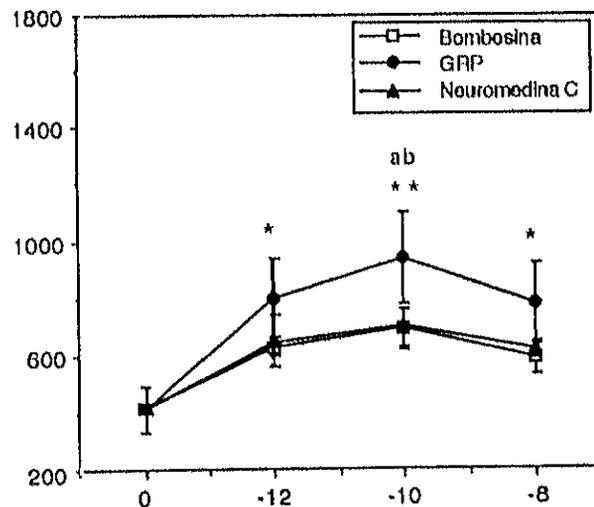


Fig 10. Capacidad quimioatrayente de las concentraciones indicadas (10^{-12} a 10^{-8} M) de BN, GRP y neuromedina C para linfocitos peritoneales. Se representa la media \pm D.E. de los valores obtenidos en 6 experimentos por duplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, respecto al control. ^a $p < 0,01$ respecto a BN. ^b $p < 0,01$ respecto a neuromedina C.

Los resultados correspondientes a la capacidad quimioatrayente que presenta el GRP a la concentración de 10^{-10} M, la más efectiva para esta actividad en linfocitos peritoneales, se muestra para el caso de los linfocitos de ganglios axilares, bazo y timo en la fig 11. En este caso también se realizaron en paralelo controles con FMLP como quimioatrayente.

Como cabía esperar el péptido formilado (FMLP) provocó un incremento significativo ($p < 0,001$) del número de linfocitos que atravesaron los filtros. Esta estimulación de la migración se produjo en linfocitos procedentes de los tres órganos linfoides estudiados: ganglios axilares, bazo y timo.

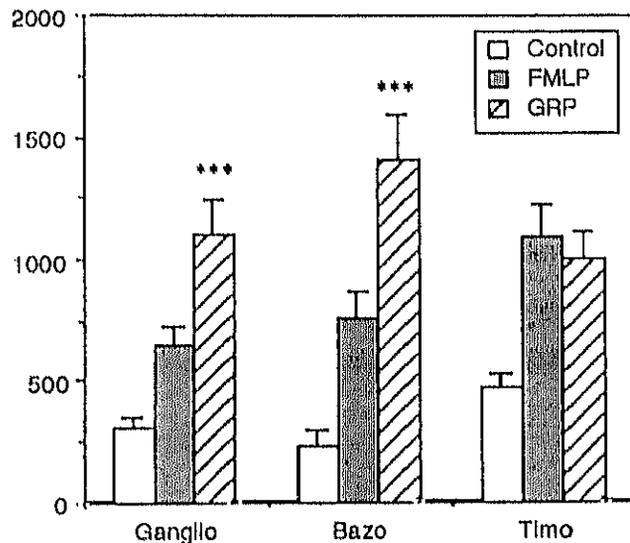


Fig 11. Capacidad quimioatrayente del GRP a la concentración de 10^{-10} M y del FMLP (10^{-8} M) para linfocitos de ganglio, bazo y timo. Se representan la media \pm D.E. de 7 experimentos realizados por duplicado. En las muestras incubadas con FMLP y con GRP los valores fueron superiores al control ($p < 0,001$) en los tres órganos. *** $p < 0,001$ con respecto al valor obtenido con FMLP.

En cuanto al efecto del GRP (10^{-10} M), éste actuó, también, como quimioatrayente, produciendo incrementos en la migración de los linfocitos significativamente superiores a los del FMLP, en el caso de las muestras obtenidas de bazo y ganglios. Sobre los linfocitos del timo, ambos péptidos, GRP y FMLP mostraron la misma capacidad quimioatrayente, con diferencias no significativas estadísticamente.

4.2.3. Proliferación.

En cuanto al efecto de los tres neuropéptidos sobre la respuesta proliferativa de linfocitos de ganglios axilares, timo y bazo, estudiamos, en primer lugar, dichos efectos en ausencia de cualquier otro posible estímulo mitógeno, lo que denominamos proliferación espontánea. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos expresados en porcentajes de estimulación respecto a controles, que representan las cpm obtenidas en presencia de los neuropéptidos respecto al valor 100 dado a las cpm en muestras incubadas en ausencia de los mismos. A la concentración de 10^{-10} M los tres péptidos estimulan la proliferación. Destaca el mayor efecto estimulador de BN, GRP y neuromedina C sobre los linfocitos de timo que sobre ganglios y bazo. Así mismo, el GRP produce un efecto estimulador mayor que la BN y la neuromedina C en timo.

TABLA 2. Porcentajes de proliferación espontánea de linfocitos de ganglios axilares, bazo y timo de ratones BALB/c en respuesta a bombesina, GRP y neuromedina C

		Ganglios	Bazo	Timo
Bombesina	10^{-8} M	120 ± 16	120 ± 13	135 ± 20 ^c
	10^{-10} M	147 ± 21 ^a	145 ± 12 ^a	174 ± 23 ^{a#}
	10^{-12} M	127 ± 18	125 ± 16	126 ± 17
GRP	10^{-8} M	116 ± 16	118 ± 15	136 ± 17 ^b
	10^{-10} M	142 ± 12 ^a	148 ± 15 ^a	241 ± 23 ^{a*#}
	10^{-12} M	126 ± 19	127 ± 17	132 ± 14 ^b
Neuromedina	10^{-8} M	118 ± 10	119 ± 15	133 ± 18 ^c
	10^{-10} M	134 ± 15 ^b	139 ± 15 ^a	173 ± 27 ^{a#}
	10^{-12} M	126 ± 16	121 ± 17	126 ± 18

Cada valor es la media ± D.E. de 8 experimentos realizados por triplicado, dando el valor 100 a las c.p.m. obtenidas en controles (N=8) sin neuropéptidos (816±211, 615±120 and 192±60 cpm para ganglios axilares, bazo y timo, respectivamente). ^a(p<0.001), ^b(p<0.01), ^c(p<0.05) respecto a controles sin neuropéptido. * (p<0.001) con respecto a bombesina o neuromedina C. # (p<0.001) con respecto a los valores obtenidos en ganglio y bazo.

Como control positivo de la proliferación se utilizó Concanavalina A ($1\mu\text{g/ml}$). Las medias de los porcentajes de proliferación en respuesta a Con A de 8 experimentos fueron las siguientes: 2654 ± 343 (ganglios axilares), 2803 ± 263 (bazo) y 3080 ± 310 (timo). Estos valores son mayores que los obtenidos con los neuropéptidos con diferencias altamente significativas ($p<0,001$).

Lo siguiente que estudiamos fue el efecto de los péptidos sobre la proliferación en respuesta a mitógenos. Se presentan los resultados obtenidos con Con A, a dos concentraciones una submitógena ($5\mu\text{g/ml}$) y una mitógena ($1\mu\text{g/ml}$), y los obtenidos con lipopolisacárido, LPS ($10\mu\text{g/ml}$).

En la tabla 3 se muestran los resultados con la concentración submitogénica de Con A y en la fig 12 los obtenidos a la concentración óptima del mitógeno. Los tres neuropéptidos, a la concentración de 10^{-10}M , inhiben la proliferación inducida por Con A independientemente de la concentración de mitógeno y del órgano de procedencia de los linfocitos. Estos neuropéptidos a la concentración de 10^{-8}M también inhiben la proliferación inducida por la dosis mitogénica de Con A en linfocitos de bazo y timo.

TABLA 3. Porcentajes de proliferación de linfocitos de ratones BALB/c en respuesta a Con A ($5\mu\text{g/ml}$) y en presencia de bombesina, GRP y neuromedina C (10^{-10}M)

	Con A	Bombesina	GRP	Neuromedina C
Ganglio	236 ± 32	$135\pm 18^{\text{a}2}$	$150\pm 18^{\text{a}}$	$121\pm 20^{\text{a}2}$
Bazo	238 ± 42	$169\pm 27^{\text{a}}$	$157\pm 28^{\text{a}}$	$165\pm 23^{\text{a}}$
Timo	225 ± 25	$166\pm 22^{\text{a}}$	$168\pm 19^{\text{a}}$	$169\pm 12^{\text{a}}$

Cada valor es la media \pm D.E. de 8 experimentos realizados por triplicado, dando el valor 100 a las c.p.m. obtenidas en controles sin neuropéptido ni mitógeno (816 ± 211 , 615 ± 120 y 192 ± 60 en ganglio, bazo y timo respectivamente). $^{\text{a}}p<0.001$ con respecto a las muestras con Con A. $^{\text{2}}p<0.01$; $^{\text{3}}p<0.05$ con respecto a los valores obtenidos con GRP.

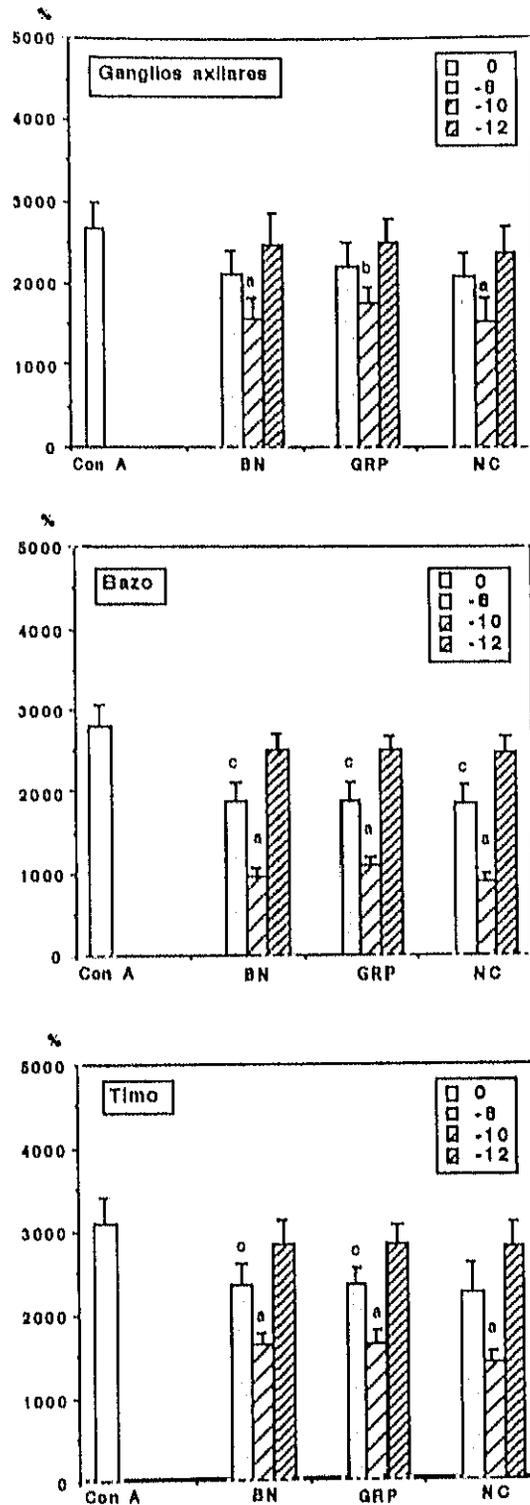


Fig 12. Porcentajes de proliferación de linfocitos de ganglio, bazo y timo en respuesta a Con A ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) e incubados con las concentraciones indicadas de BN, GRP y neuromedina C. Se representan la media \pm D.E. de los resultados de 8 experimentos por triplicado. $c_p < 0,05$, $b_p < 0,01$, $a_p < 0,001$ respecto al valor control sin neuropéptido.

En la fig 13 se presentan los resultados obtenidos tras la incubación de los linfocitos con LPS (10 μ g/ ml) y con los neuropéptidos. También se observa una disminución de la respuesta al mitógeno en presencia de bombesina, GRP y neuromodina C. La concentración de 10^{-10} M es, al igual que se ha indicado para el caso de la Con A, la que presenta mayor capacidad Inhibidora en los tres órganos y con los tres neuropéptidos.

En el bazo la concentración de 10^{-8} M de bombesina y de GRP también producen inhibición de la respuesta proliferativa a LPS, y en el caso del timo es la neuromodina C la que lo hace a todas las concentraciones estudiadas.

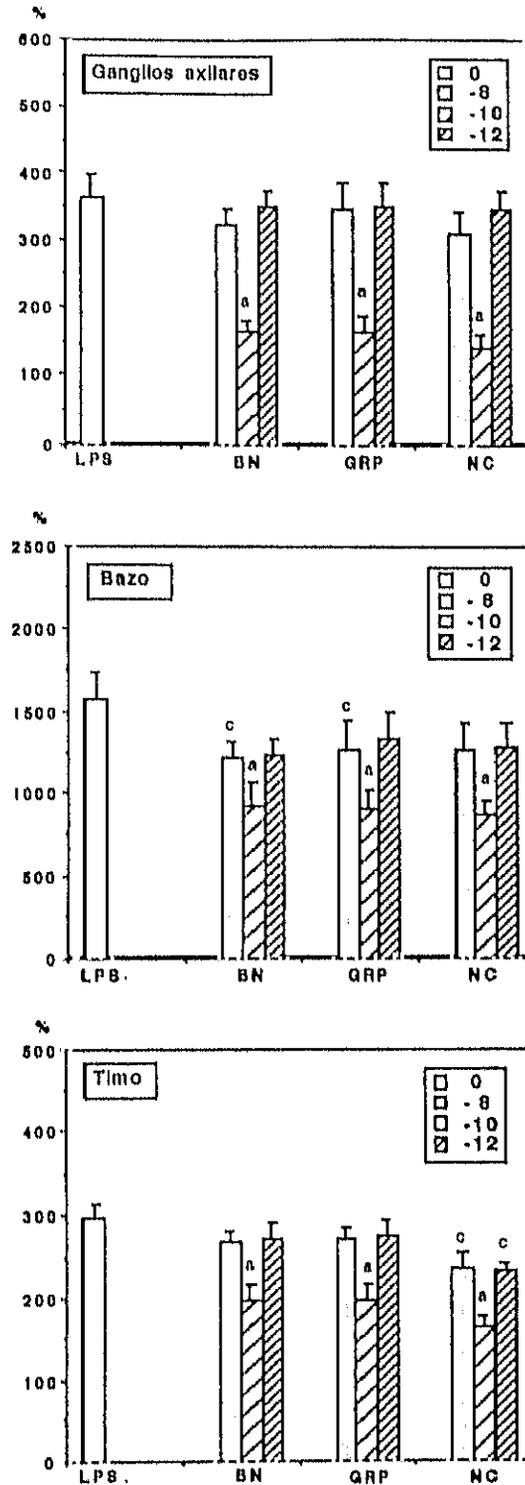


Fig 13. Porcentajes de proliferación de linfocitos de ganglio, bazo y timo en respuesta a LPS (10 μ g/ml) e incubados con las concentraciones indicadas de BN, GRP y neuromedina C. Se representan la media \pm D.E. de los resultados de 8 experimentos por triplicado. ^c $p < 0,05$. ^b $p < 0,01$. ^a $p < 0,001$ respecto al valor control sin neuropéptido.

4.3. Efecto de bombesina, GRP y neuromedina C sobre la funcionalidad de las células citotóxicas.

Se exponen a continuación los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la BN, GRP y neuromedina C sobre la actividad citotóxica natural (NK) y la dependiente de anticuerpo (ADCC) de leucocitos obtenidos del peritoneo y de timo, bazo y ganglios axilares.

4.3.1. Actividad *natural killer* (NK).

Con respecto al efecto de bombesina, GRP y neuromedina C sobre la citotoxicidad natural (NK), en primer lugar se muestran los resultados obtenidos al realizar los ensayos de citotoxicidad con células procedentes del peritoneo como efectoras, los datos se expresan en porcentajes de lisis de células YAC-1.

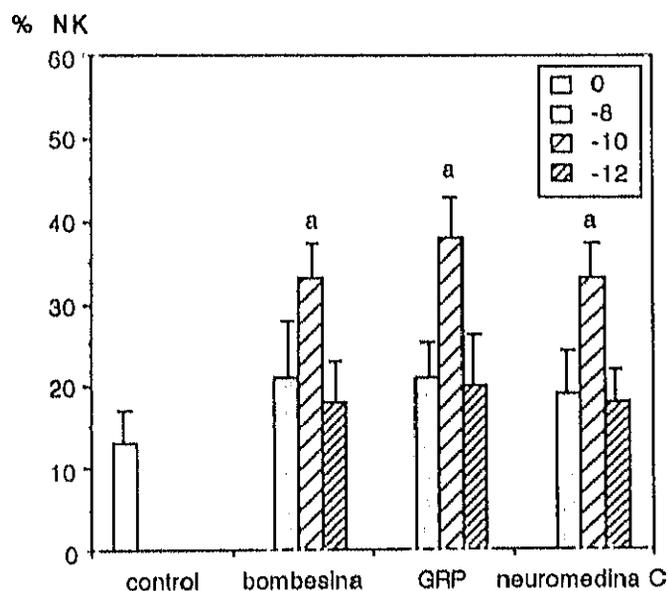


Fig 14. Porcentajes de citotoxicidad natural (NK) de leucocitos peritoneales en presencia de las concentraciones que se indican de BN, GRP y neuromedina C, usando células YAC-1 como diana a una relación efectora:diana de 50:1. Se representan la media \pm D.E. de los valores obtenidos en 6 experimentos realizados por triplicado. ^a $p < 0.001$ con respecto al control.

Tanto bombesina como GRP y neuromedina C, a la concentración de 10^{-10} M, produjeron un incremento muy significativo de la citotoxicidad natural sin diferencias estadísticas significativas entre los tres neuropéptidos.

A continuación pasamos a estudiar estos efectos en muestras de leucocitos obtenidas de órganos linfoides

En la tabla 4 de la página siguiente, se exponen los resultados obtenidos al utilizar leucocitos de: bazo, timo y ganglios axilares, como efectoras. También en este caso se observa un incremento en los porcentajes de lisis en respuesta a la incubación con los neuropéptidos a la concentración más fisiológica (10^{-10} M). Los mayores porcentajes de lisis se obtuvieron en bazo y los menores en timo. La relación efectora:diana más efectiva fue la de 50:1 y el GRP el péptido que produjo una mayor estimulación en los tres órganos. Bombesina y neuromedina C produjeron los máximos incrementos en los porcentajes de lisis cuando las células efectoras procedían de bazo y de timo.

Los tres neuropéptidos a la concentración de 10^{-10} M, también estimularon la citotoxicidad en leucocitos procedentes de los tres órganos cuando se utilizaron células K562 humanas como dianas, aunque los porcentajes de estimulación fueron menores que al utilizar YAC-1 (fig 15).

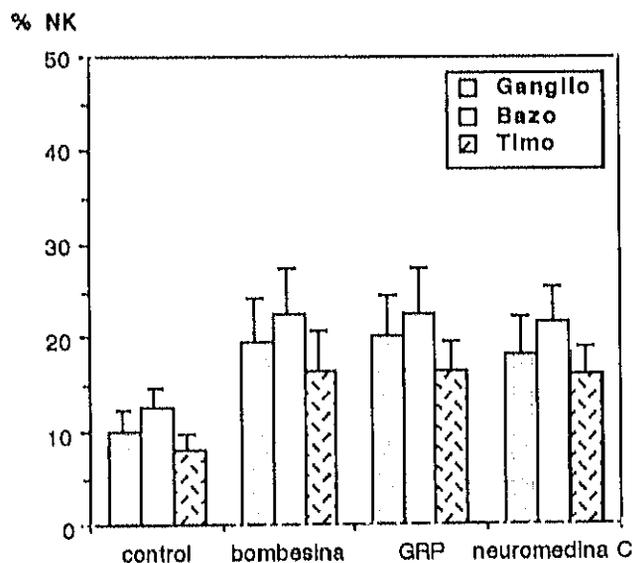


Fig 15. Porcentajes de citotoxicidad natural (NK) de leucocitos peritoneales en presencia de las concentraciones que se indican de BN, GRP y neuromedina C, usando células K562 como diana a una relación efectora:diana de 50:1. Se representan la media \pm D.E. de los valores obtenidos en 6 experimentos realizados por triplicado. Todos los valores de las muestras incubadas con los neuropéptidos fueron mayores que en controles, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

TABLA 4. Efecto de bombesina, GRP y neuromedina C (10^{-10} M) en el porcentaje de citotoxicidad natural (NK) de leucocitos de ratones BALB/c usando células YAC-1 a diferentes relaciones efectora/ diana.

Ganglios axilares			
	100:1	50:1	25:1
Control	20±4	26±7	20±4
Bombesina	27±6 ^c	35±7 ^b	33±5 ^b
GRP	31±5 ^a	40±8 ^a	35±5 ^a
Neuromedina C	23±5 ^c	30±7	23±4 ^c

Bazo			
	100:1	50:1	25:1
Control	35±7	40±10	30±8
Bombesina	62±15 ^a	72±13 ^a	62±11 ^a
GRP	60±10 ^a	80±13 ^a	75±16 ^a
Neuromedina C	62±10 ^a	68±15 ^a	65±12 ^a

Timo			
	100:1	50:1	25:1
Control	14±2	13±2	12±2
Bombesina	21±3 ^a	28±4 ^a	25±4 ^a
GRP	19±3 ^a	29±4 ^a	21±3 ^a
Neuromedina C	23±5 ^a	25±5 ^a	23±4 ^a

Los valores son la media± D.E. de seis experimentos realizados por triplicado.
^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.05$.

4.3.2. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o actividad *killer* (K). En la fig 15 se observa que los tres péptidos a la concentración 10^{-10} M estimularon esta actividad citotóxica de células peritoneales.

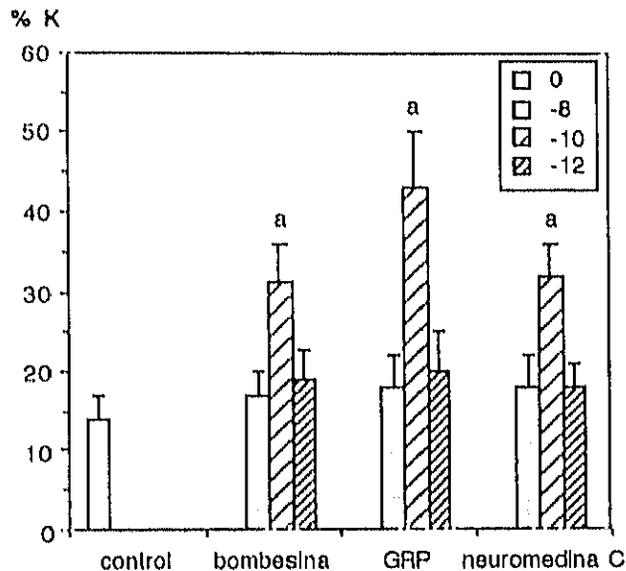


Fig 16. Porcentajes de citotoxicidad (ADCC) de leucocitos peritoneales incubados con las concentraciones que se indican de BN, GRP y neuromedina C, usando células K562 como diana a una relación efectora:diana de 50:1. Se representan la media \pm D.E. de los valores obtenidos en 6 experimentos realizados por triplicado. ^a $p < 0,001$ con respecto al control.

En cuanto a los resultados obtenidos con células procedentes de bazo, timo y ganglios axilares (tabla 5), los tres péptidos incrementaron los porcentajes de lisis de células K562 utilizando diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal anti-CD15 (1:200; 1:500; 1:1000) y una relación efectora:diana de 100:1, la cual demostró ser la más efectiva en ensayos previos. Los valores más altos se obtuvieron con la dilución 1:500 del anticuerpo, y el GRP mostró la mayor capacidad estimuladora de la CCDA en leucocitos.

TABLA 5. Efecto de bombesina, GRP y neuromedina C (10^{-10} M) en el porcentaje de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de leucocitos de ratones BALB/c usando células K562 a una relación efectora/ diana de 100:1 y a diferentes diluciones de anticuerpo.

Ganglios axilares			
	1:200	1:500	1:1000
Control	20±4	21±4	15±3
Bombesina	27±4	31±5	28±5
GRP	28±4	40±8	32±7
Neuromedina C	26±5	31±5	24±5

Bazo			
	1:200	1:500	1:1000
Control	15±6	19±4	18±4
Bombesina	20±3	28±4	22±5
GRP	20±5	28±6	27±5
Neuromedina C	19±5	27±5	22±6

Timo			
	1:200	1:500	1:1000
Control	15±4	19±6	15±4
Bombesina	23±6	25±5	23±7
GRP	26±5	32±5	24±5
Neuromedina C	26±5	25±5	23±5

Los valores son la media ± D.E. de seis experimentos realizados por triplicado. Todos los resultados de las muestras incubadas con los neuropéptidos fueron estadísticamente superiores a controles ($p < 0.01$).

4.4. Estudios de colaboración intercelular.

Para intentar comprender mejor la forma de actuación de estos neuropéptidos en la modulación de la respuesta inmune, nos propusimos estudiar los posibles cambios en la secreción de citocinas por las células inmunes incubadas en presencia de los neuropéptidos. Se eligieron citocinas implicadas en la respuesta proliferativa ya estudiada, la IL-1 y la IL-2 también implicada en citotoxicidad, así como el factor de fusión de macrófagos (FFM) responsable de la formación de células gigantes multinucleadas (MGC), con gran actividad fagocítica.

4.4.1. Producción de IL-1 β .

En la fig 17 se representa la cantidad de IL-1 β valorada en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos incubados en presencia de BN, GRP y neuromedina C, en presencia o ausencia de un estimulante de la secreción de IL-1, la Con A (ya utilizada como control y como mitógeno en otras pruebas).

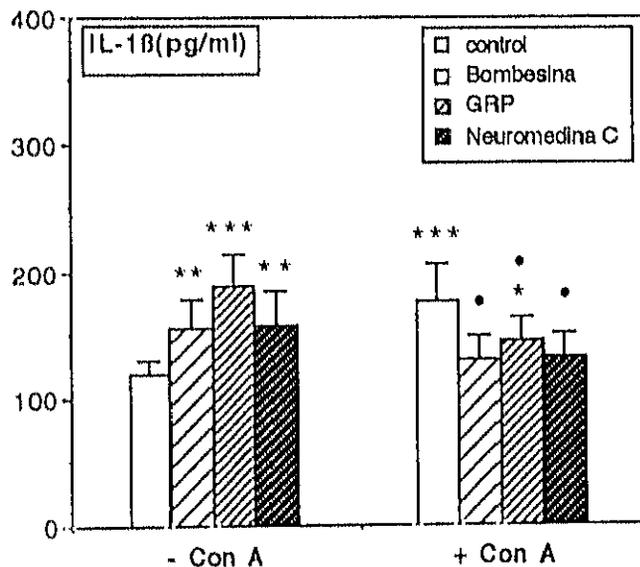


Fig 17. Cantidad de IL-1 β obtenida de sobrenadantes de cultivos de macrófagos peritoneales incubados con una concentración 10^{-10} M de BN, GRP o neuromedina C. En presencia o no de Con A ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$). Se representa la media \pm D.E. de 3 experimentos realizados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al control sin neuropéptido y sin Con A. * $p < 0,05$ respecto al valor con Con A.

Como se puede observar en la fig 17, en presencia de Con A se produce una mayor liberación de IL-1 β por parte de los macrófagos que en controles, con diferencias altamente significativas. Los tres neuropéptidos también aumentan significativamente la liberación de IL-1 β , principalmente el GRP. Sin embargo, estos neuropéptidos en presencia de Con A provocan una disminución en los niveles de la interleucina, en relación a la producida por la Con A.

4.4.2. Producción de IL-2.

En la fig 18 se muestran los resultados de la valoración de IL-2 en sobrenadantes de cultivos de linfocitos incubados en presencia de los neuropéptidos. No se observa en este caso un incremento significativo en los niveles de IL-2 en respuesta a los neuropéptidos aunque sí en respuesta a Con A utilizada como control positivo.

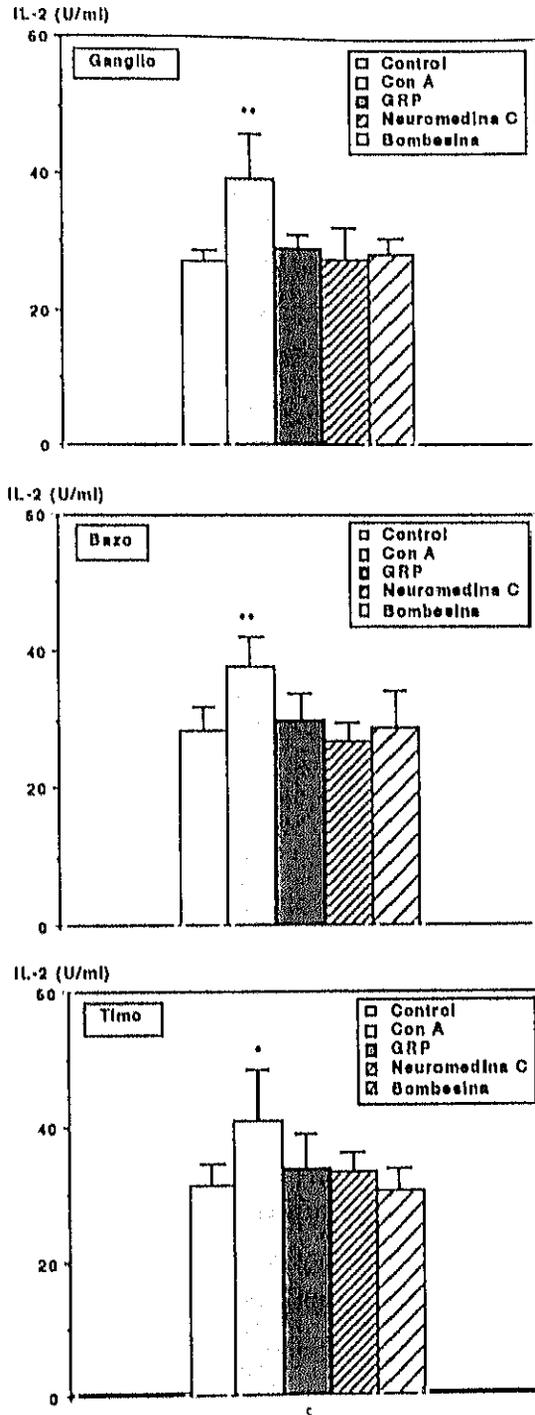


Fig 18. Cantidad de IL-2 obtenida de sobrenadantes de cultivos de linfocitos peritoneales incubados con una concentración 10^{-10} M de BN, GRP o neuromedina C. Se realizaron controles con Con A ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$). Se representa la media \pm D.E. de 3 experimentos realizados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; respecto al control sin neuropéptido y sin Con A.

4.4.3. Producción de FFM.

Así mismo se valoró la producción de una tercera citocina, el factor de fusión de macrófagos (FFM) mediante el recuento de la población de células gigantes multinucleadas (MGC) encontradas en muestras de peritoneo incubadas con GRP (10^{-10} M), con PHA (a una dilución 1:1280) como conocido estimulador de la producción de FFM y con ambos.

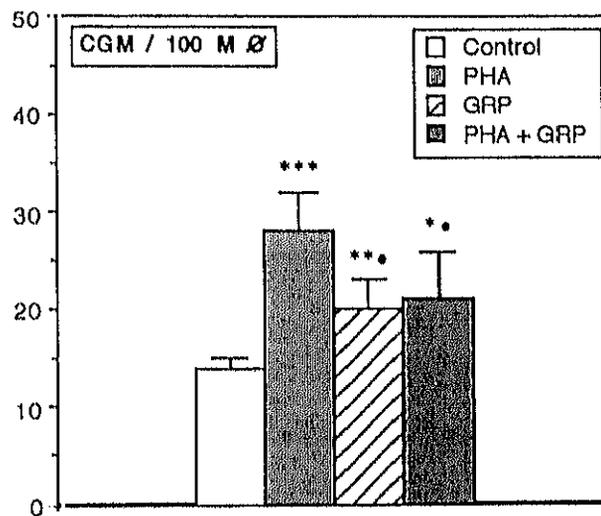


Fig 19. Número de células multinucleadas gigantes (MGC) por cien macrófagos en muestras peritoneales incubadas con GRP (10^{-10} M), con PHA o con ambos. Se representa la media \pm D.E. de 6 experimentos por triplicado. * $p < 0,05$ respecto al control. • $p < 0,05$ respecto al valor con PHA.

Como se observa de los resultados expuestos en la fig 19, aparece un aumento ($p < 0,001$) del número de MGC en presencia del control positivo, PHA, respecto al control. También en presencia de GRP se obtiene un número de MGC significativamente superior al detectado en controles ($p < 0,01$). El efecto de PHA se ve significativamente reducido cuando se añade GRP.

4.5. Efecto de los tres péptidos en incubaciones previas al ensayo.

Para comprobar si era necesaria la presencia de los neuropéptidos a lo largo de todo el ensayo para poder ejercer su acción o no, elegimos una de las pruebas funcionales que por su protocolo permitiese la preincubación. Descartamos los cultivos por ser demasiado larga pudiendo enmascarar el resultado y escogimos la citotoxicidad. En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en leucocitos de ganglios axilares, bazo y timo que fueron incubados con concentraciones 10^{-8} , 10^{-10} o 10^{-12} M de GRP durante 1 h y posteriormente, tras eliminar la presencia del neuropéptido, son utilizados para analizar su actividad NK.

TABLA 6. Efecto sobre el porcentaje de citotoxicidad (NK) de leucocitos de ganglios axilares, bazo y timo de ratones BALB/C jóvenes machos, de la incubación (1h) previa al ensayo con tres concentraciones molares de GRP, usando YAC-1 como células diana a una relación E:D 10:1.

Concentración (M)	ganglios		bazo		timo	
	P	NP	P	NP	P	NP
0	22±1	21±1	20±1	21±3	17±3	17±2
10^{-8}	23±3	25±2	31±1	32±8	22±3	22±2
10^{-10}	39±4	37±3	37±1	42±11	31±7	30±3
10^{-12}	31±5	27±3	26±3	30±7	21±1	22±6

Los resultados son la media \pm DE de cinco experimentos realizados por duplicado.

Como se puede observar no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos con muestras incubadas con GRP previamente al ensayo (P: preincubación) y los encontrados en muestras incubadas en presencia del péptido durante las 4h que dura la prueba (NP: no preincubación). Esto sucede a las tres concentraciones de GRP utilizadas y en los leucocitos de los tres órganos empleados.

4.6. Estudio de la especificidad de los efectos de los neuropéptidos.

Una vez probados los efectos de los péptidos de la familia de la bombesina sobre la funcionalidad de las células inmunocompetentes, se procedió a analizar la especificidad de tales efectos. Para ello se incluyó en una serie de experimentos un antagonista del receptor para la bombesina, (Leu13-y CH₂NH-Leu14)-BN, y se procedió también a estudiar la presencia de receptores en las células estudiadas.

4.6.1. Utilización del antagonista del receptor para la bombesina.

Este estudio se efectuó en dos pruebas: la capacidad quimioatrayente que presentan estos neuropéptidos frente a macrófagos y linfocitos peritoneales y la actividad NK de leucocitos de órganos inmunocompetentes como el timo.

4.6.1.1. Efecto del antagonista en la capacidad quimioatrayente de los neuropéptidos.

Se incubaron las células del peritoneo con el antagonista de la BN y los neuropéptidos (a la concentración que había demostrado ser la más efectiva, 10⁻¹⁰M), y se obtuvieron los resultados que se muestran en la fig 20 para macrófagos (parte superior) y para linfocitos (parte inferior). Se observa como la capacidad quimioatrayente de la bombesina y del GRP se revierte en presencia del antagonista. Se utilizó otro péptido que es un probado quimioatrayente para macrófagos y linfocitos, el péptido formilado (FMLP), como control y al igual que el control sin péptidos, no sufrió una reducción de su efecto quimioatrayente en presencia del antagonista de la bombesina.

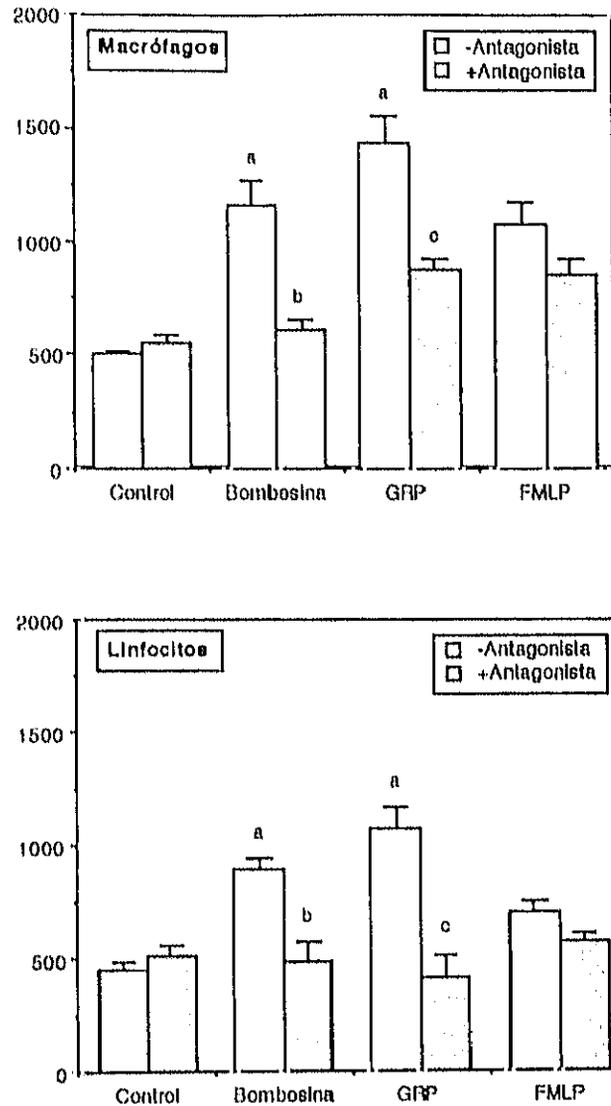


Fig 20. Capacidad quimioatrayente de la concentración de 10^{-10} M de BN y GRP para macrófagos (arriba) y para linfocitos (abajo) peritoneales en presencia (barras sombreadas) y en ausencia (barras blancas) del antagonista de la BN. Se representa la media \pm D.E. de los valores obtenidos en 5 experimentos por duplicado. ^a $p < 0,01$ respecto al control; ^b $p < 0,01$ respecto a BN sin antagonista; ^c $p < 0,01$ respecto a GRP sin antagonista.

4.6.1.2. Efecto del antagonista en la actividad NK.

Por otra parte, se probó el antagonista en ensayos de citotoxicidad de leucocitos de timo que fueron incubados con tres concentraciones de GRP (10^{-8} , 10^{-10} y 10^{-12} M) en presencia y en ausencia del antagonista.

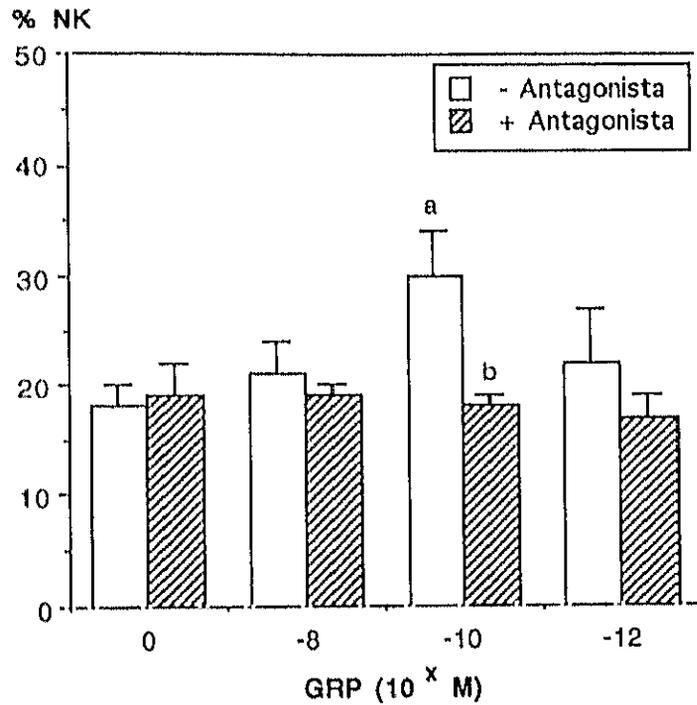


Fig 21. Porcentajes de lisis de la citotoxicidad natural, NK, de linfocitos de timo en presencia de las tres concentraciones que se indican de GRP e incubados con o sin el antagonista. Los valores son la media \pm D.E. de 5 experimentos por duplicado. ^a $p < 0,01$ con respecto al control; ^b $p < 0,01$ respecto a la concentración 10^{-10} M de GRP sin antagonista.

Como se aprecia por los resultados obtenidos (fig 21), también en este caso, el efecto estimulador de la concentración de 10^{-10} M del GRP fue revertido en presencia del antagonista.

4.6.2. Ensayos de unión al neuropéptido marcado.

Para determinar la presencia de receptores para los neuropéptidos estudiados en las células inmunocompetentes, sobre las que se había demostrado su acción, se realizaron ensayos de unión al neuropéptido marcado (BN y GRP).

4.6.2.1. Unión a macrófagos peritoneales.

En la fig 22 se muestran los resultados obtenidos al incubar macrófagos peritoneales con diversas concentraciones de BN, GRP y neuromedina C, así como con un péptido ajeno a dicha familia, el neuropéptido Y (NPY), en presencia de una concentración constante de BN marcada con ^{125}I .

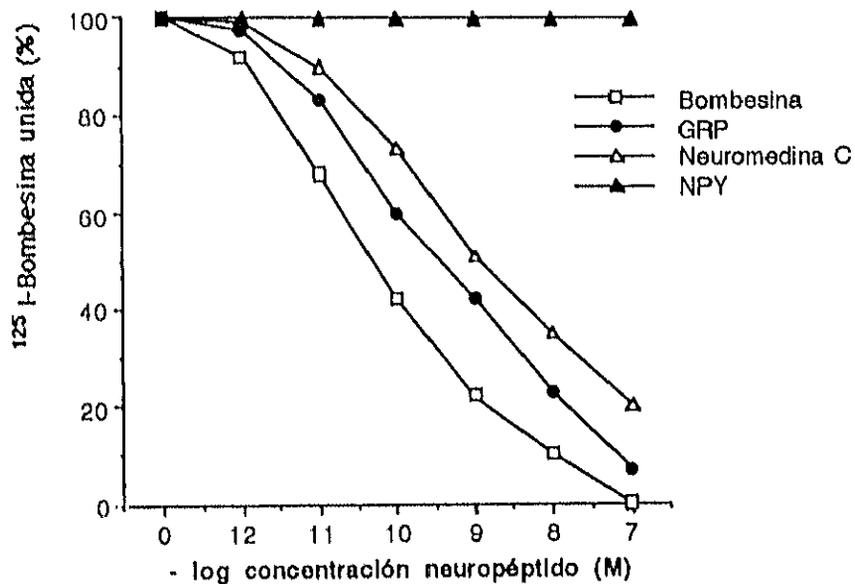


Fig 22. Porcentajes de unión de ^{125}I -BN a macrófagos peritoneales incubados con las concentraciones que se indican de BN, GRP, neuromedina C y NPY. Se representan la media respecto a la unión máxima (obtenida en ausencia de neuropéptido frío) de tres experimentos por triplicado.

Como se puede observar, la bombesina se une a la membrana plasmática de los macrófagos de forma específica ya que añadiendo un péptido sin similitud en su secuencia aminoacídica a la bombesina no fue capaz de desplazar a este neuropéptido marcado. En cambio sí se observa desplazamiento de la unión en presencia de GRP y en menor medida en presencia de neuromedina C.

En la fig 23 se muestran los resultados obtenidos al valorar en este caso el desplazamiento de la unión de GRP marcado, a macrófagos peritoneales.

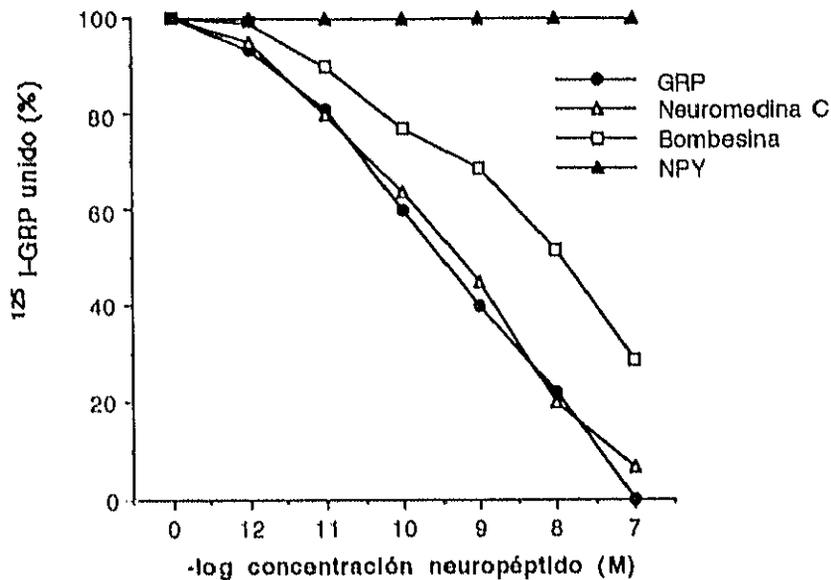


Fig 23. Porcentajes de unión de ^{125}I -GRP a macrófagos peritoneales incubados con las concentraciones que se indican de BN, GRP, neuromedina C y NPY. Se representan la media respecto a la unión máxima (obtenida en ausencia de neuropéptido frío) de tres experimentos por triplicado.

De nuevo en este caso se observa el desplazamiento en la unión del GRP marcado producido por la unión de este mismo neuropéptido sin marcar y también tras la adición de bombesina y neuromedina C. Tampoco en este caso el neuropéptido Y fue capaz de desplazar la unión del GRP a los macrófagos.

De la representación de Scatchard de los datos obtenidos se identificaron dos tipos de receptores en macrófagos peritoneales uno de alta y otro de baja afinidad y se calcularon las constantes de afinidad. En el caso de la bombesina fueron: $K_d=2,7\pm 0,4$ nM y $K_d=64,2\pm 7,1$ nM. Para el GRP fueron $K_d=1,1\pm 0,07$ nM y $K_d=79,0\pm 8,6$ nM. Así mismo se calculó la concentración de sitios de unión que fueron $38,0\pm 3,5$ fmol/ 10^6 células y $420,5\pm 65,0$ fmol/ 10^6 células para la BN, y $6,0\pm 1,0$ fmol/ 10^6 células y $703,3\pm 32,2$ fmol/ 10^6 células para el GRP.

4.6.2.2. Unión a linfocitos de ganglios axilares.

Al contrario que lo observado en macrófagos, los linfocitos no expresan receptores para la bombesina ni para el GRP, a un nivel que puedan ser detectados por la técnica de unión llevada a cabo. Los datos obtenidos en los experimentos de unión que se llevaron a cabo con linfocitos purificados de ganglios axilares se presentan en la tabla 11.

TABLA 7. Porcentajes de unión de neuropéptido marcado a linfocitos purificados a diferentes concentraciones de neuropéptido sin marcar

	- log concentración BN (M)				
	8	9	10	11	12
% unión	84±15	95±1	71±3	84±8	76±11

	- log concentración GRP (M)				
	8	9	10	11	12
% unión	80±5	89±4	71±4	70±5	78±1

Cada valor es la media \pm D.E. de tres experimentos realizados por triplicado.

Como se observa los porcentajes de unión del neuropéptido marcado: bombesina o GRP, son siempre elevados e independientes de la concentración de neuropéptido no marcado añadido al ensayo.

4.7. Efecto de los péptidos en poblaciones celulares purificadas.

Una vez comprobado que los tres neuropéptidos objeto del presente estudio presentaban un efecto estimulador sobre la funcionalidad de los macrófagos, de los linfocitos y sobre la actividad citotóxica, y visto el carácter específico de esta acción, así como la carencia de niveles de receptores detectables, por las técnicas de unión, en linfocitos, pasamos a estudiar el efecto que estos neuropéptidos tienen en las poblaciones celulares purificadas.

No olvidemos que los estudios realizados hasta el momento sobre los efectos en la función celular se han efectuado con la población leucocitaria total presente, tanto fagocitos como linfocitos, aunque según el caso observamos los efectos en uno u otro tipo celular.

La base de la separación leucocitaria ha sido la capacidad o no de adherencia a sustrato. Puesto que los linfocitos B presentan esta capacidad al igual que los macrófagos, utilizamos tripsina, como se describe en métodos, para purificar los macrófagos.

4.7.1. Efecto comparado de los neuropéptidos sobre la función de macrófagos purificados del peritoneo y la suspensión peritoneal completa.

Se escogieron las dos pruebas que por su metodología permitan este estudio: la fagocitosis, que se realiza previa formación de una monocapa adherente sobre las mismas placas en las que se desarrolla posteriormente el ensayo y la citotoxicidad, que de la misma forma se realiza en placas de cultivo.

4.7.1.1. En fagocitosis de latex.

Para estudiar el posible efecto diferencial de los neuropéptidos sobre los macrófagos peritoneales en relación al total de la población adherente peritoneal se escogió la prueba de ingestión de partículas inertes (bolas de latex) y se ensayó en ambas poblaciones. La metodología empleada en esta prueba permite purificar la población de macrófagos peritoneales sobre las mismas placas MIF donde se realiza posteriormente el ensayo fagocítico.

En los resultados obtenidos, expuestos en la fig 24 de la página siguiente, no se observan diferencias significativas entre la estimulación de la fagocitosis producida por el GRP en macrófagos purificados con respecto a la producida sobre la población peritoneal adherente total.

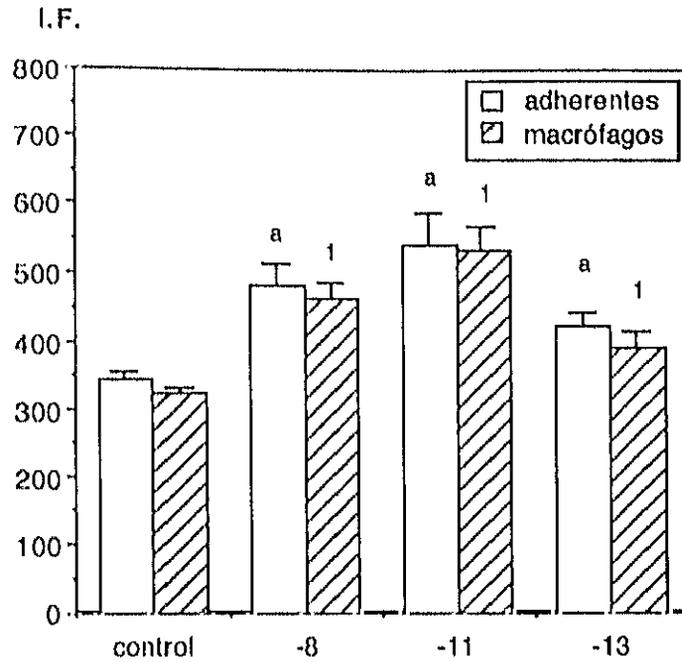


Fig 24. Número de bolas de latex fagocitadas por cien macrófagos (IF) incubados en presencia de las concentraciones que se indican en abscisas, de GRP, en la población adherente peritoneal total (columnas blancas) y en macrófagos purificados (columna rayada). Los valores son la media \pm D.E. de 5 experimentos por duplicado. ^a $p < 0,001$ con respecto al control de células adherentes; ¹ $p < 0,001$ con respecto al control de macrófagos.

4.7.1.2. En la actividad citotóxica.

En los siguientes experimentos, se estudió el posible efecto diferencial de los péptidos sobre macrófagos purificados del peritoneo y la suspensión peritoneal total en ensayos de citotoxicidad. Los resultados se presentan en la tabla 7.

Como se puede observar no se aprecian diferencias entre los efectos producidos por los tres péptidos sobre la capacidad citotóxica de macrófagos purificados o de muestras del peritoneo total.

TABLA 8. Efecto de tres concentraciones molares de bombesina, GRP y neuromedina C en el porcentaje de citotoxicidad natural de peritoneo completo y de macrófagos peritoneales purificados de ratones BALB/c usando células YAC-1 como diana.

	Control	Bombesina		
		10^{-8}	10^{-10}	10^{-12}
P.Completo	13±4	21±7	33±8 ^a	18±5
Macrófagos	12±3	15±2	26±8 ¹	18±2

	Control	GRP		
		10^{-8}	10^{-10}	10^{-12}
P.Completo	13±4	21±4	38±11 ^a	20±6
Macrófagos	12±3	16±4	30±5 ¹	19±3

	Control	Neuromedina C		
		10^{-8}	10^{-10}	10^{-12}
P.Completo	13±4	19±5	33±8 ^a	18±4
Macrófagos	12±3	16±6	24±7 ¹	15±4

Los valores son la media ± D.E. de seis experimentos realizados por triplicado.
^a p<0.001 respecto a su correspondiente control; ¹ p<0.001 respecto a su correspondiente control.

4.7.2. Efecto comparado sobre muestras completas y purificadas de linfocitos.

Se pretendía conocer si la acción moduladora de estos péptidos sobre la funcionalidad del linfocito se ejercía directamente sobre él o a través de las células accesorias adherentes, como macrófagos. Para ello se estudiaron los efectos de estos péptidos sobre la funcionalidad del linfocito en muestras completas y en muestras dopacionadas de células accesorias y enriquezidas en linfocitos T. Las poblaciones purificadas contenían un 97% de células T según se comprobó por inmunodetección con anti-Thy1.

4.7.2.1. Quimiotaxis.

En primer lugar se presentan los resultados obtenidos en cuanto al efecto del GRP sobre la quimiotaxis en linfocitos peritoneales.

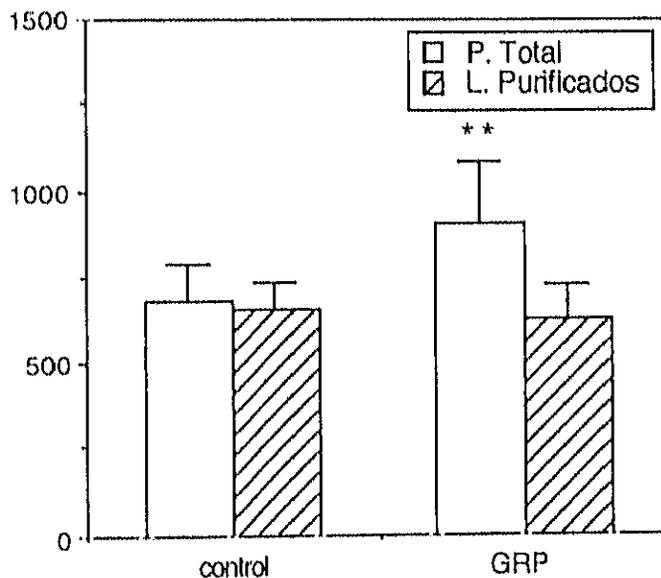


Fig 25. Índices de quimiotaxis de linfocitos obtenidos del peritoneo incubados con GRP (10^{-10} M) mantenidos en la suspensión peritoneal completa o purificados a partir de la misma. Se representa la media \pm D.E. de 7 experimentos realizados por duplicado. ** $p < 0,01$ respecto al control sin neuropéptido.

En la fig 25 se muestran los índices de quimiotaxis de linfocitos obtenidos del peritoneo en respuesta a la incubación con GRP a la concentración que resultó ser la más efectiva, (10^{-10} M). Para estudiar la forma de actuación del neuropéptido, se ensayó su efecto en linfocitos mantenidos en la suspensión peritoneal completa (P.Total) y en linfocitos aislados del peritoneo (L. purificados).

Se observa la desaparición del efecto estimulador de la quimiotaxis producido por el GRP a la concentración de 10^{-10} M, cuando los linfocitos están purificados.

Por otra parte, en la fig 26 se exponen comparadamente, los resultados obtenidos al incubar con GRP, a tres concentraciones, muestras de leucocitos obtenidos de bazo, timo y ganglios axilares o linfocitos purificados de dichos órganos.

No se observa ningún efecto del neuropéptido sobre la quimiotaxis de linfocitos purificados no adherentes, mayoritariamente linfocitos T, de órganos linfoides. El ligero efecto estimulador que se observa a la concentración de 10^{-10} M de GRP sobre linfocitos en suspensiones no purificadas de ganglios axilares desaparece al estar los linfocitos purificados y también, el efecto inhibitor encontrado en timo con esa misma concentración de GRP, se pierde cuando la quimiotaxis se analiza en linfocitos purificados de dicho órgano.

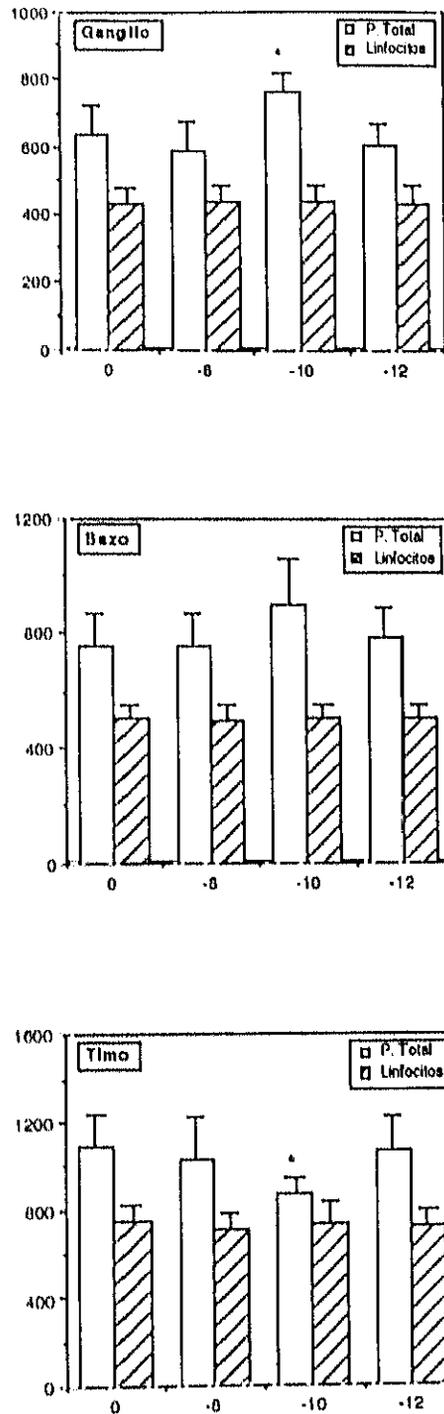


Fig 26. Indices de quimiotaxis de linfocitos obtenidos de ganglios axilares, bazo y timo incubados con las concentraciones que se indican de GRP mantenidos en la suspensión celular completa o purificados a partir de la misma. Se representa la media \pm D.E. de 5 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0.05$ respecto a su control.

4.7.2.2. Linfoproliferación.

Una vez probados los efectos mitogénicos de los neuropéptidos de la familia de la bombosina sobre la linfoproliferación, procedimos a estudiar los efectos de los neuropéptidos sobre dicha capacidad linfóide en muestras enriquecidas en linfocitos T. Así se puede determinar si esta acción moduladora de los neuropéptidos se lleva a cabo directamente sobre el linfocito o a través de las células adherentes, como macrófagos. Para ello, linfocitos no adherentes aislados de suspensiones celulares obtenidas de órganos linfoides: bazo, timo y ganglios axilares, fueron incubados con bombosina, GRP y neuromedina C a la concentración 10^{-10} M que resultó ser la más efectiva en los ensayos previos de proliferación. De este modo, se puede conocer el efecto en la proliferación espontánea, en ausencia de mitógeno, sobre los linfocitos T. Para determinar el efecto de los neuropéptidos sobre la proliferación de los linfocitos T purificados en presencia de mitógeno se incorporó Con A a concentración de $1\mu\text{g} / \text{ml}$.

Los resultados comparados entre muestras completas de leucocitos y las muestras de linfocitos purificados se presentan en las fig 27 y 28, en ausencia y en presencia de Con A, respectivamente. Los valores se expresan como porcentajes de proliferación respecto a controles sin neuropéptido ni mitógeno y cuyos valores en c.p.m. fueron 816 ± 211 , 615 ± 120 y 192 ± 60 en ganglio, bazo y timo, respectivamente, en la población leucocítica total, y 212 ± 49 , 187 ± 56 y 200 ± 31 en muestras de linfocitos T purificados.

No se observó efecto de los neuropéptidos en la proliferación espontánea (fig 27) ni en la inducida por Con A (fig 28) cuando los linfocitos se encontraban purificados, lo que se representa en la figura como "linfocitos no adherentes" frente a "leucocitos" que representa la población total de leucocitos obtenida de los órganos.

4.7.2.3. Capacidad citotóxica.

El siguiente paso fue el estudio de los posibles efectos de los péptidos sobre la actividad citotóxica natural y sobre la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de linfocitos T purificados por adherencia comparado con lo que ocurría en muestras completas obtenidas de órganos linfoides. Como puede observarse en las fig 29, 30 y 31 y en las tablas 9, 10 y 11, ninguno de los tres péptidos mantuvieron sus efectos estimuladores cuando las muestras consistían en linfocitos T purificados, tanto en la citotoxicidad NK, como en la ADCC.

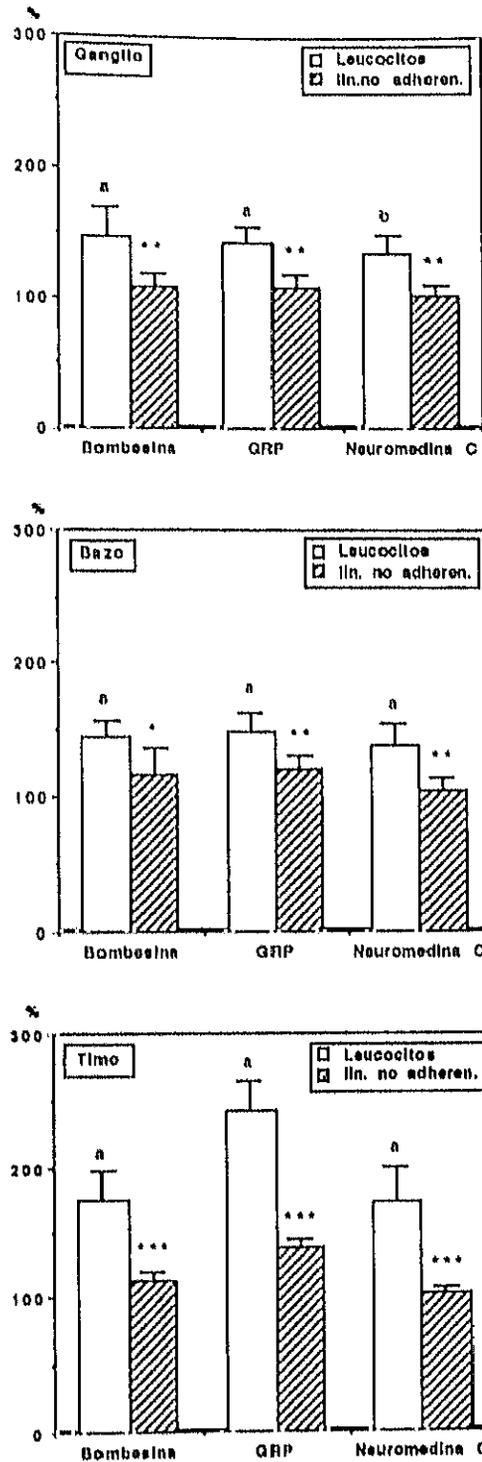


Fig 27. Porcentajes de proliferación de linfocitos de ganglio, bazo y timo incubados con BN, GRP o neuromedina C (10^{-10} M) en la suspensión leucocítica total y en los linfocitos T purificados (no adherentes). Se representan la media \pm D.E. de los resultados de 8 experimentos por triplicado. ^b $p < 0,01$. ^a $p < 0,001$ respecto al valor control en la población total de leucocitos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al valor en leucocitos con los respectivos neuropéptidos.

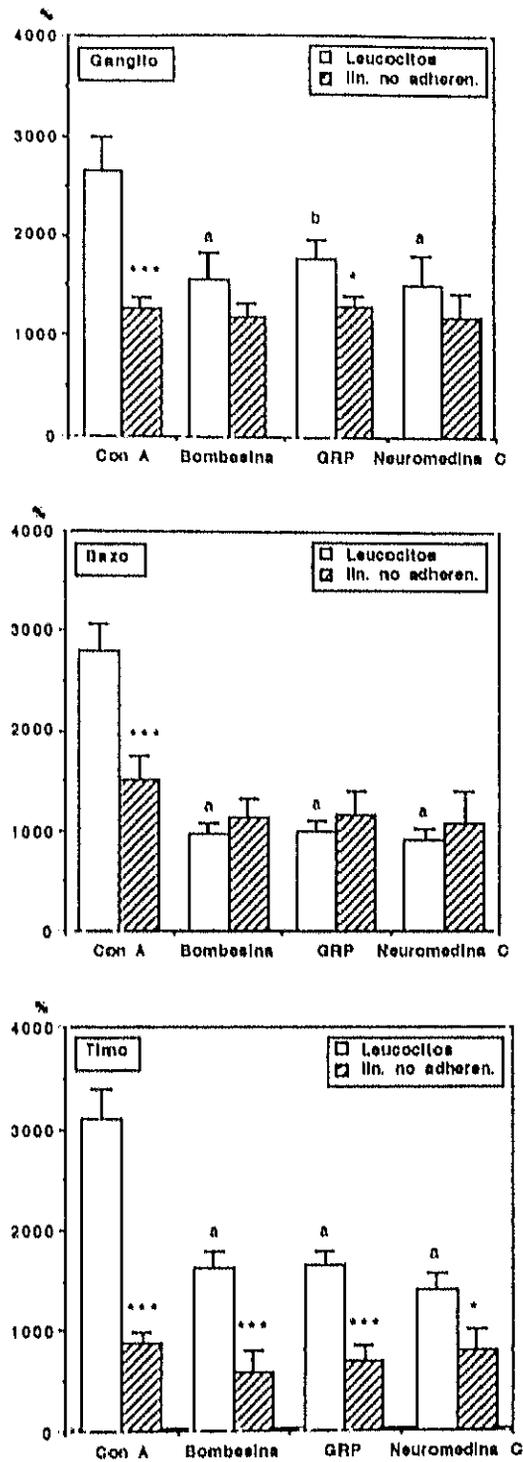


Fig 28. Porcentajes de proliferación de linfocitos de ganglio, bazo y timo en respuesta a Con A ($1\mu\text{g/ml}$) e incubados con BN, GRP o neuromedina C (10^{-10} M) en la suspensión leucocítica total y en los linfocitos T purificados (no adherentes). Se representan la media \pm D.E. de los resultados de 8 experimentos por triplicado. ^b $p < 0,01$; ^a $p < 0,001$ respecto al valor control en la población total de leucocitos. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ respecto al valor en leucocitos con los neuropéptidos

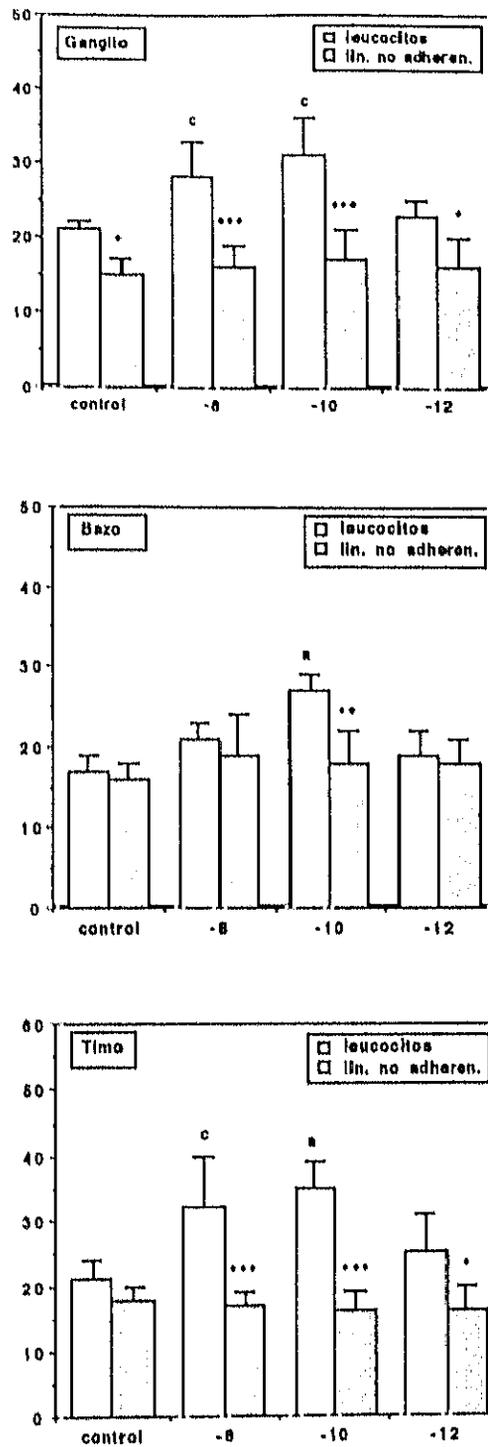


Fig 29. Porcentajes de citotoxicidad natural de la suspensión leucocítica total y de los linfocitos T purificados (no adherentes) de ganglio, bazo y timo incubados con BN a las concentraciones que se indican. Se representan la media \pm D.E. de los resultados de 8 experimentos por triplicado. ^a $p < 0,001$; ^c $p < 0,05$, respecto al valor control en la población de leucocitos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al valor en leucocitos con los respectivos neuropéptidos.

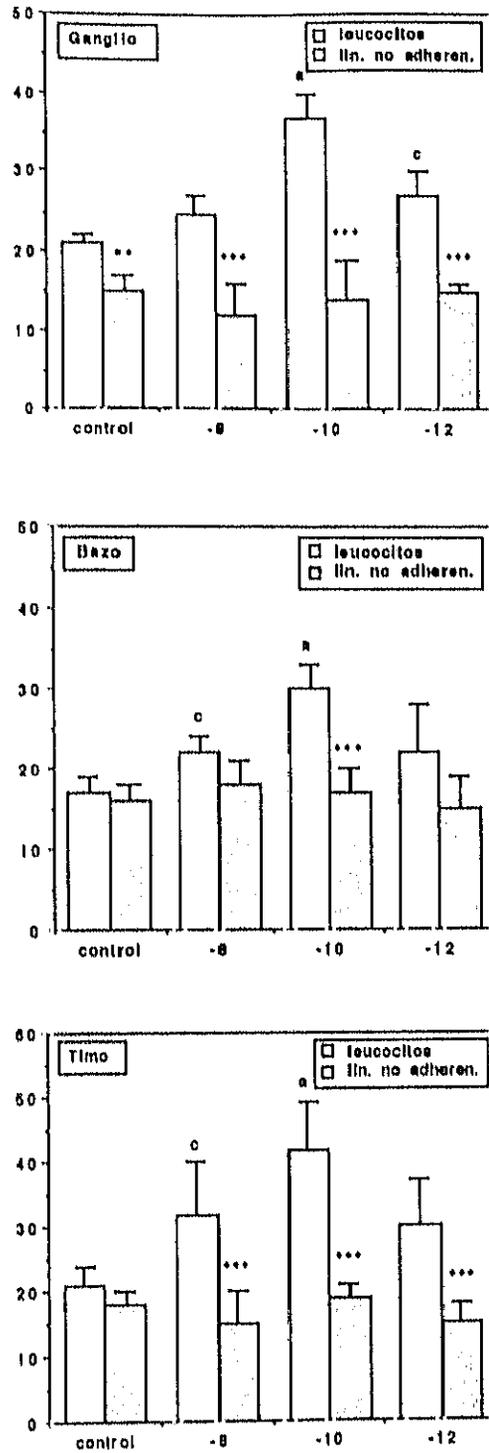


Fig 30. Porcentajes de citotoxicidad natural de la suspensión leucocítica total y de los linfocitos T purificados (no adherentes) de ganglio, bazo y timo incubados con GRP a las concentraciones que se indican. Se representan la media \pm D.E. de los resultados de 8 experimentos por triplicado. ^a $p < 0,001$; ^c $p < 0,05$, respecto al valor control en la población de leucocitos. ^{**} $p < 0,01$; ^{***} $p < 0,001$ respecto al valor en leucocitos con los respectivos neuropéptidos.

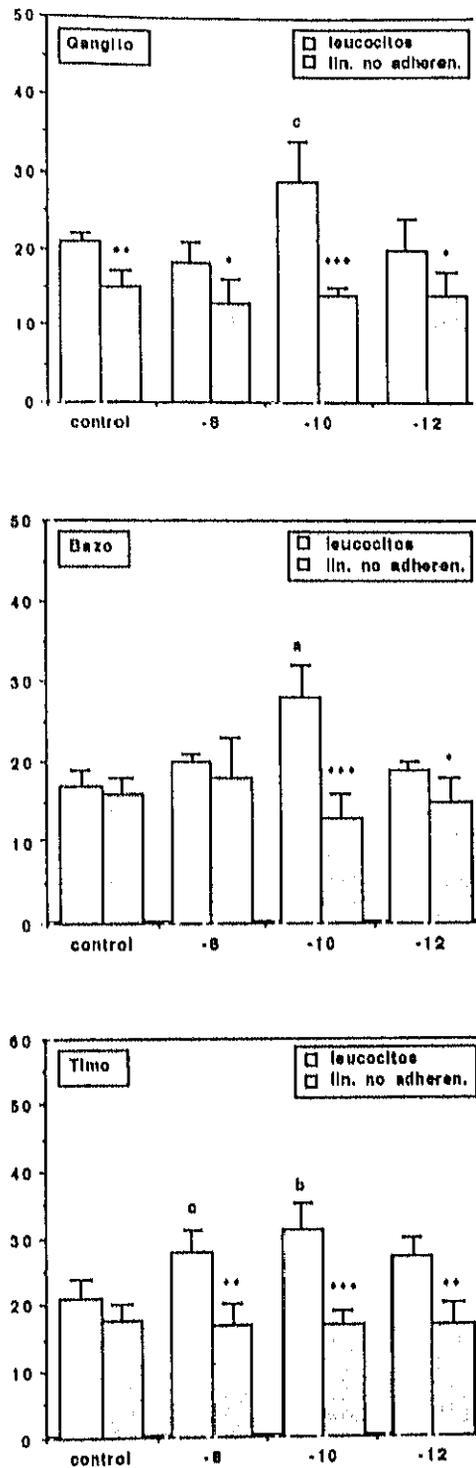


Fig 31. Porcentajes de citotoxicidad natural de la suspensión leucocítica total y de los linfocitos T purificados (no adherentes) de ganglio, bazo y timo incubados con neuromedina C a las concentraciones que se indican. Se representan la media \pm D.E. de los resultados de 8 experimentos por triplicado. ^a $p < 0,001$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,05$, respecto al valor control en la población de leucocitos. ^{*} $p < 0,05$; ^{**} $p < 0,01$; ^{***} $p < 0,001$ respecto al valor en leucocitos con los respectivos neuropéptidos.

TABLA 9. Efecto de tres concentraciones molares de bombesina, GRP y neuromedina C en el porcentaje de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de leucocitos totales y de linfocitos T purificados de ganglios axilares de ratones BALB/c usando células K562 como diana y una dilución 1:500 de anticuerpo.

	Control	Bombesina		
		10^{-8}	10^{-10}	10^{-12}
Leucocitos	19±1	21±3	29±1 ^a	20±2
Linfocitos T	16±3	15±1	15±1	16±2

	Control	GRP		
		10^{-8}	10^{-10}	10^{-12}
Leucocitos	19±1	23±1	32±4 ^a	23±5
Linfocitos T	16±3	14±4	17±2	17±1

	Control	Neuromedina C		
		10^{-8}	10^{-10}	10^{-12}
Leucocitos	19±1	19±1	29±1 ^a	21±5
Linfocitos T	16±3	16±3	13±4	14±2

Los valores son la media ± D.E. de cinco experimentos realizados por duplicado.

^a $p < 0.001$ respecto a su control.

TABLA 10. Efecto de tres concentraciones molares de bombesina, GRP y neuromodina C en el porcentaje de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de leucocitos totales y de linfocitos T purificados de bazo de ratones BALB/c usando células K562 como diana y una dilución 1:500 de anticuerpo.

	Control	Bombesina		
		10^{-8}	10^{-10}	10^{-12}
Leucocitos	19±1	23±2	26±5 ^a	23±4
Linfocitos T	17±1	19±5	18±5	21±5

	Control	GRP		
		10^{-8}	10^{-10}	10^{-12}
Leucocitos	19±1	25±6	31±8 ^a	23±4
Linfocitos T	17±1	17±2	20±3	20±1

	Control	Neuromodina C		
		10^{-8}	10^{-10}	10^{-12}
Leucocitos	19±1	23±7	29±4 ^a	25±7
Linfocitos T	17±1	16±3	18±4	16±3

Los valores son la media ± D.E. de cinco experimentos realizados por duplicado.

^a $p < 0.001$ respecto a su control.

TABLA 11. Efecto de tres concentraciones molares de bombesina, GRP y neuromedina C en el porcentaje de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de leucocitos totales y de linfocitos T purificados de timo de ratones BALB/c usando células K562 como diana y una dilución 1:500 de anticuerpo.

	Control	Bombesina		
		10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹²
Leucocitos	17±2	23±2	26±2 ^a	21±1
Linfocitos T	15±1	18±3	14±4	17±2

	Control	GRP		
		10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹²
Leucocitos	17±2	23±2	29±3 ^a	20±2
Linfocitos T	15±1	13±2	15±2	14±4

	Control	Neuromedina C		
		10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹²
Leucocitos	17±2	17±1	25±2 ^a	20±1
Linfocitos T	15±1	14±2	15±4	14±2

Los valores son la media± D.E. de cinco experimentos realizados por duplicado.

^a $p < 0.001$ respecto a su control.

4.8. Producción de un factor por las células adherentes, responsable de los efectos de los neuropéptidos en la función linfode.

Para profundizar en la forma de actuación de los neuropéptidos sobre la funcionalidad de los linfocitos, realizamos unos ensayos para determinar si era necesaria una interacción de las células: linfocito y adherente, o si la información se transmitía a través de algún mediador soluble producido por estas últimas, que podrían ser linfocitos adherentes, prioritariamente linfocitos B, o macrófagos.

Para ello se ensayó el efecto del GRP a la concentración más efectiva, 10^{-10} M, en la quimiotaxis de linfocitos mantenidos en la suspensión peritoneal completa (P.Total) y de linfocitos T purificados del peritoneo (L. purificados) y se ensayó un tercer grupo consistente en linfocitos aislados del peritoneo a los que se añadió el sobrenadante de una suspensión de células adherentes del peritoneo (macrófagos y linfocitos B) o de una suspensión de macrófagos purificados, que fue previamente incubada con GRP (10^{-10} M).

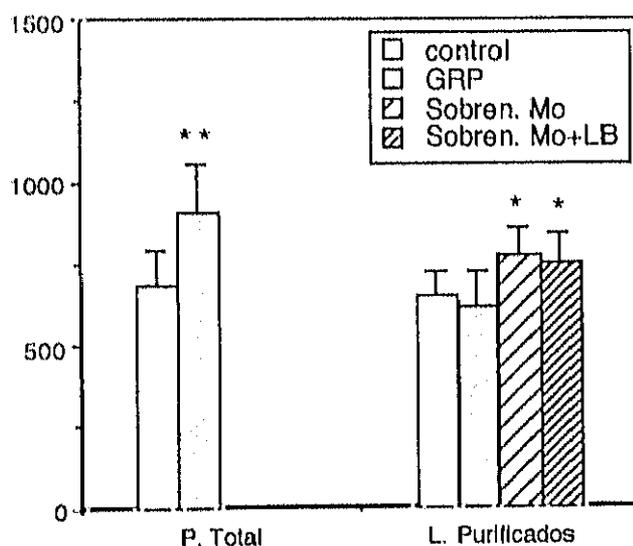


Fig 32. Índices de quimiotaxis de linfocitos obtenidos del peritoneo purificados y sin purificar (P.Total) incubados con GRP (10^{-10} M), o con el sobrenadante de células adherentes o de macrófagos, peritoneales incubados con el neuropéptido. Se representa la media \pm D.E. de 7 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto al control sin neuropéptido.

Los resultados muestran que el efecto del GRP se conserva en muestras purificadas de linfocitos a las que se añadieron los sobrenadantes de la suspensión peritoneal completa del peritoneo incubada en presencia de GRP. Este hecho apunta la posibilidad de que la señal del neuropéptido, en este caso de estimulación, pase a los linfocitos a través de un factor soluble que sería secretado por las células adherentes, probablemente macrófagos, dado que los resultados no varían significativamente si se añade el sobrenadante de macrófagos purificados o de la población adherente total.

4.9. Mecanismos de acción intracelular de los tres neuropéptidos: Bombesina, GRP y Neuromedina C.

Para descubrir que tipo de señales intracelulares estaban implicadas en la activación de las células inmunes por los neuropéptidos de la familia de la bombesina, decidimos estudiar los principales segundos mensajeros de las dos vías clásicas de transducción de señales: la ruta de la adenilato ciclasa y la de los inosítoles fosfato, para ello valoramos los niveles de AMPc intracelular y los de 1,4,5-inositol trifosfato (IP₃), así como la subsecuente activación de la proteína quinasa C.

4.9.1. Niveles de AMPc intracelular.

La valoración de los niveles de AMPc intracelular se efectuó en macrófagos peritoneales y en linfocitos de ganglios axilares.

4.9.1.1. En macrófagos.

En la tabla 12 se muestran los niveles intracelulares de AMPc obtenidos de macrófagos incubados con bombesina, GRP y neuromedina C a las concentraciones que se indican (10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} M) y a tres tiempos 30, 60 y 120 segundos.

Tabla 12. Niveles de AMPc (pmol/ 10^8 células) en macrófagos peritoneales incubados con bombesina, GRP y neuromedina C.

Tiempo	Concentración	Control	BN	GRP	Neuromedina C
30	0	32 ± 4	—	—	—
	10^{-9} M	—	28 ± 3	22 ± 5*	24 ± 3*
	10^{-10} M	—	25 ± 4*	22 ± 4**	24 ± 4*
	10^{-11} M	—	29 ± 3	25 ± 6	26 ± 5
60	0	31 ± 6	—	—	—
	10^{-9} M	—	29 ± 4	26 ± 5	26 ± 5
	10^{-10} M	—	26 ± 3	28 ± 6	28 ± 4
	10^{-11} M	—	30 ± 4	30 ± 8	27 ± 4
120	0	30 ± 5	—	—	—
	10^{-9} M	—	29 ± 3	28 ± 4	30 ± 4
	10^{-10} M	—	29 ± 4	29 ± 5	29 ± 5
	10^{-11} M	—	30 ± 4	28 ± 4	27 ± 5

Se representa la media ± D.E. de 4 experimentos por duplicado. *p<0,05; **p<0,01 respecto a los valores control.

Se observa una reducción significativa de los niveles intracelulares de AMPc con los tres péptidos a los 30 s de incubación y con la concentración de 10^{-10} M. Con GRP y neuromedina C también aparece esa reducción a 10^{-9} M.

4.9.1.2. En linfocitos

En la tabla 13 se exponen los datos obtenidos al valorar los niveles de AMPc en linfocitos de ganglios axilares incubados con bombesina, GRP y neuromedina C.

Tabla 13. Niveles de AMPc (pmol/ 10^8 células) en linfocitos de ganglios axilares incubados con bombesina, GRP y neuromedina C.

Tiempo	Concentración	Control	BN	GRP	Neuromedina C
30	0	83± 12	—	—	—
	10^{-9} M	—	61 ± 10***	55 ± 10***	67 ± 12***
	10^{-10} M	—	67 ± 11***	55 ± 9***	67 ± 12***
	10^{-11} M	—	70 ± 9***	54 ± 7***	60 ± 8***
60	0	79 ± 11	—	—	—
	10^{-9} M	—	77 ± 12	79± 13	75± 11
	10^{-10} M	—	79 ± 10	79 ± 14	74 ± 11
	10^{-11} M	—	79 ± 9	80 ± 14	77 ± 12
120	0	79 ± 9	—	—	—
	10^{-9} M	—	76 ± 12	80 ± 12	78 ± 11
	10^{-10} M	—	76 ± 9	78 ± 12	77 ± 11
	10^{-11} M	—	77 ± 12	78 ± 12	77 ± 10

Se representa la media ± D.E. de 4 experimentos por duplicado. *** $p < 0,001$ respecto al valor control.

Los tres neuropéptidos producen una rápida disminución muy significativa en los niveles intracelulares de AMPc. Para comprobar que la medida era realizada correctamente añadimos el péptido intestinal vasoactivo (VIP) para el que está demostrada la elevación de los niveles de AMPc. Los valores obtenidos al añadir VIP (10^{-8} M) fueron: 234 ± 37 pmol/ 10^8 células a 30s ($p < 0,001$); 129 ± 25 a 60s ($p < 0,01$) y 87 ± 18 a 120s.

4.9.2. Niveles de IP₃.

La valoración de los niveles de IP₃ se llevó a cabo en macrófagos peritoneales así como en linfocitos de ganglios axilares.

4.9.2.1. En macrófagos.

En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a los niveles intracelulares de IP₃ expresados en pmol/10⁸ macrófagos incubados con bombesina, GRP y neuromedina C a las concentraciones que se indican (10⁻⁹, 10⁻¹⁰ y 10⁻¹¹) y a tres tiempos 30, 60 y 120 s.

Tabla 14. Niveles de IP₃ (pmol/ 10⁸ células) en macrófagos peritoneales incubados con bombesina, GRP y neuromedina C.

Tiempo	Concentración	Control	BN	GRP	Neuromedina C
30	0	16 ± 5	—	—	—
	10 ⁻⁹ M	—	23 ± 5	22 ± 5	23 ± 5
	10 ⁻¹⁰ M	—	23 ± 5	23 ± 6	23 ± 5
	10 ⁻¹¹ M	—	20 ± 6	22 ± 6	21 ± 5
60	0	13 ± 4	—	—	—
	10 ⁻⁹ M	—	17 ± 5	18 ± 5 [*]	18 ± 5 [*]
	10 ⁻¹⁰ M	—	24 ± 6 ^{**}	23 ± 5 ^{**}	24 ± 6 ^{**}
	10 ⁻¹¹ M	—	22 ± 6 [*]	19 ± 6 [*]	20 ± 5 [*]
120	0	10 ± 3	—	—	—
	10 ⁻⁹ M	—	13 ± 3	12 ± 4	11 ± 3
	10 ⁻¹⁰ M	—	13 ± 4	12 ± 3	12 ± 2
	10 ⁻¹¹ M	—	9 ± 2	9 ± 2	10 ± 3

Se representa la media ± D.E. de 4 experimentos por duplicado. *p<0,05; **p<0,01 respecto a los valores control.

Al contrario de lo que ocurría con los niveles de AMPc, se observó un incremento significativo de los niveles intracelulares de IP₃ en macrófagos peritoneales, con los tres péptidos a los 60 s de incubación y a la concentración de 10⁻¹⁰ M, y con bombesina también a la de 10⁻⁹ M.

4.9.2.2. En linfocitos.

En la tabla 15 se recogen los resultados obtenidos al valorar los niveles de IP_3 en leucocitos de ganglios axilares.

Tabla 15. Niveles de IP_3 (pmol/ 10^8 células) en linfocitos de ganglios axilares incubados con bombesina, GRP y neuromedina C.

Tiempo	Concentración	Control	BN	GRP	Neuromedina C
30	0	29 ± 6	—	—	—
	10^{-9} M	—	35 ± 4*	32 ± 5	32 ± 6
	10^{-10} M	—	35 ± 5*	37 ± 6*	37 ± 5*
	10^{-11} M	—	35 ± 5*	36 ± 6*	38 ± 5**
60	0	28 ± 5	—	—	—
	10^{-9} M	—	38 ± 6**	37 ± 6**	37 ± 5**
	10^{-10} M	—	41 ± 5***	40 ± 5***	40 ± 5***
	10^{-11} M	—	35 ± 5*	34 ± 5*	30 ± 4
120	0	29 ± 7	—	—	—
	10^{-9} M	—	30 ± 7	30 ± 5	31 ± 7
	10^{-10} M	—	29 ± 4	31 ± 6	30 ± 6
	10^{-11} M	—	31 ± 6	31 ± 7	30 ± 5

Se representa la media ± D.E. de 5 experimentos por duplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto a los valores control.

También en la población linfocítica de ganglios axilares, los tres neuropéptidos incrementaron los niveles de IP_3 a los 30 y 60 s. Dándose el mayor incremento a los 60 s y con la concentración 10^{-10} M de los tres péptidos.

4.9.3. Actividad Proteína quinasa C.

Además de IP₃, la hidrólisis de fosfolípidos de membrana genera diacilglicerol, que a su vez activa la proteína quinasa C favoreciendo su traslocación del citosol a la membrana, lo que pasamos a valorar a continuación.

4.9.3.1. Actividad PKC en leucocitos.

La implicación de la PKC en la transducción de la señal de los neuropéptidos fue confirmada valorando la actividad de la enzima en las células inmunocompetentes estudiadas: población de leucocitos de ganglios axilares, y macrófagos y linfocitos purificados.

Tabla 16. Actividad proteína quinasa C (pmol/min/10⁶ células) en membranas y citosol de leucocitos obtenidos de ganglios axilares.

Sustancia	Concentración	Actividad PKC	
		Membranas	Citosol
Control	...	5,1 ± 1,2	10,3 ± 1,0
PMA	50 ng/ ml	15,3 ± 3,7 ^a	10,0 ± 1,1
Con A	1 µg/ ml	14,1 ± 1,1 ^a	9,7 ± 2,4
Bombesina	10 ⁻⁹ M	8,7 ± 2,2 ^a	8,6 ± 0,8 ^a
	10 ⁻¹⁰ M	15,5 ± 1,4 ^a	10,5 ± 1,7
	10 ⁻¹¹ M	12,6 ± 2,0 ^a	9,7 ± 1,7
GRP	10 ⁻⁹ M	7,3 ± 1,1 ^a	7,8 ± 1,6 ^a
	10 ⁻¹⁰ M	15,0 ± 1,3 ^a	9,6 ± 1,7
	10 ⁻¹¹ M	11,6 ± 1,9 ^a	8,5 ± 1,6
Neuromedina C	10 ⁻⁹ M	8,5 ± 1,0 ^a	8,5 ± 1,3 ^a
	10 ⁻¹⁰ M	12,6 ± 2,3 ^a	10,4 ± 1,8
	10 ⁻¹¹ M	9,8 ± 1,4 ^a	7,7 ± 1,2 ^a

Los resultados son la media ± D.E. de 5 experimentos realizados por duplicado.

^ap < 0.001 respecto a sus controles.

En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos al valorar la actividad PKC en leucocitos obtenidos de ganglios axilares, como órgano representativo. Como se observa, los tres neuropéptidos estimulan por igual la actividad PKC alcanzando valores próximos a los obtenidos con PMA, conocido activador de ésta enzima.

Se realizaron algunas pruebas añadiendo retinal como probado Inhibidor de la activación de la PKC producida por PMA. Las muestras incubadas con PMA + retinal dieron una actividad de $6,8 \pm 1,9$ significativamente menor que la obtenida con PMA ($p < 0,001$). Así mismo se incubaron muestras con GRP + retinal y también la estimulación de la actividad PKC por GRP fue reducida significativamente ($p < 0,01$) en presencia de retinal dando una actividad $9,0 \pm 1,1$ pmol/ min/ 10^6 células.

4.9.3.2. Actividad PKC en macrófagos y linfocitos purificados.

En la siguiente tabla se exponen los resultados obtenidos en ensayos de actividad PKC en poblaciones celulares purificadas: macrófagos del peritoneo y linfocitos de ganglios axilares.

Tabla 17. Actividad proteína kinasa C (pmol/min/ 10^6 células) en membranas y citosol de macrófagos purificados de peritoneo y linfocitos purificados obtenidos de ganglios axilares.

Tratamiento	Macrófagos		Linfocitos	
	Membranas	Citosol	Membranas	Citosol
Control	$5,5 \pm 0,7$	$11,3 \pm 1,3$	$4,7 \pm 0,4$	$9,3 \pm 1,8$
PMA (50ng/ml)	$21,5 \pm 1,5^b$	$7,2 \pm 1,6^b$	$13,6 \pm 1,7^b$	$7,3 \pm 0,7^b$
PMA + retinal (20 μ M)	$8,1 \pm 2,3^*$	$8,8 \pm 2,1$	$5,1 \pm 1,0^*$	$9,2 \pm 1,4^*$
GRP (10^{-10} M)	$13,5 \pm 2,3^b$	$5,2 \pm 2,1^b$	$13,0 \pm 1,9^b$	$6,2 \pm 2,0^b$
GRP + retinal	$7,9 \pm 2,4^*$	$8,4 \pm 2,3^*$	$7,2 \pm 1,7^*$	$9,2 \pm 1,7^*$

Los resultados son la media \pm D.E. de 5 experimentos realizados por duplicado.
^b $p < 0,01$ respecto a sus controles. * $p < 0,01$ respecto a los valores sin retinal.

En las poblaciones purificadas se sigue observando la activación de la PKC por el GRP a niveles similares. Tanto el efecto del PMA como el del GRP se encuentra rovertido hasta casi alcanzar los valores controles, en presencia de retinal.

En la fig 32 se exponen de forma comparada los resultados en cuanto a la activación de la proteína kinasa C por PMA y GRP (10^{-10} M) en macrófagos purificados de peritoneo, linfocitos T y leucocitos totales de ganglios axilares.

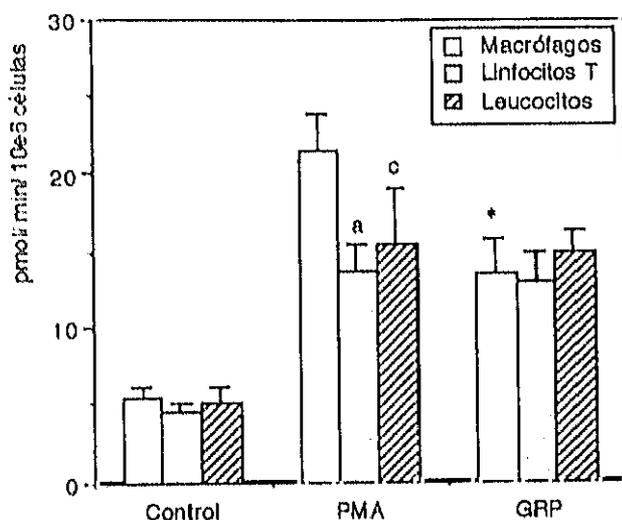


Fig 33. Actividad PKC en pmol/ min/ 10^6 células en muestras de macrófagos peritoneales, linfocitos T y leucocitos totales de ganglios axilares en respuesta a PMA (50 ng/ml) y a GRP (10^{-10} M). Los valores son la media \pm D.E. de 5 experimentos por duplicado. * $p < 0,001$ respecto al valor con PMA. ^a $p < 0,001$; ^c $p < 0,05$ respecto al valor en macrófagos.

En las tres poblaciones celulares se produjo un significativo aumento ($p < 0,001$) de la actividad proteína kinasa C tras la incubación con el GRP. En los leucocitos y linfocitos T purificados de ganglios axilares esta mayor actividad enzimática llega a ser del mismo nivel que el alcanzado con el PMA.

5. DISCUSSION

5. DISCUSION

La existencia de una estrecha interrelación entre los sistemas nervioso e inmune se sustenta a nivel anatómico con la presencia de fibras nerviosas en órganos linfoides primarios y secundarios. Muchas de estas fibras que acompañan a los vasos sanguíneos y están íntimamente asociadas con varios tipos celulares como linfocitos, macrófagos y mastocitos, son peptidérgicas habiéndose encontrado en ellas inmunoreactividad para diversos neuropéptidos como la sustancia P, VIP o el NPY (Folten y cols., 1985 y 1988). Además de estos hechos, en las células inmunes se han detectado receptores para toda una serie de neuropéptidos y se han comprobado los efectos moduladores de algunos de ellos sobre la respuesta inmune. Otro dato que apoya la compleja interrelación entre los sistemas reguladores es la presencia de neuropéptidos en órganos y células inmunes (Blalock y cols., 1988). Hechos todos ellos que ya han sido comentados más ampliamente en la introducción de esta memoria.

Por otra parte, en las terminaciones nerviosas que inervan el tracto digestivo, se liberan muchos de esos neuropéptidos, y si tenemos presente el importante componente inmune en esta localización (Bienenstock y cols., 1988; Dockray y cols., 1979) parece evidente la modulación que podrían ejercer sobre esas células inmunes dichos neuropéptidos.

Como ya se ha comentado en la introducción, los efectos moduladores que, sobre la función inmune, tiene uno de los grupos de neuropéptidos asociados al tracto digestivo, el de la familia de la bombesina, han sido muy poco estudiados y de forma puntual. Entre estos estudios y dentro del marco de la relación neuroendocrina-inmune, el hecho de que la BN se comporte como mitógeno para determinadas líneas celulares, especialmente en células transformadas (Rozengurt y Sinnott-Smith, 1983), y como agente quimioatrayente para linfocitos (Moore y cols., 1984) y monocitos (Ruff y cols., 1985), aumentó nuestro interés por realizar un estudio más completo sobre esta familia de péptidos.

Se eligió como animal de experimentación el ratón (*Mus musculus*), por ser en el que mejor estandarizados se encuentran los estudios inmunológicos. Además, se trata de una especie en la cual se dispone de cepas singénicas perfectamente "tipadas" en cuanto a su genética y expresión de antígenos implicados en la respuesta inmune.

Las pruebas fueron realizadas *in vitro*, lo que permitió conocer los efectos de los neuropéptidos sobre células aisladas y por tanto, sin interferencias de otras sustancias

como hormonas o metabolitos producidos por otros elementos sistémicos que pudieran enmascarar o alterar los resultados.

Los neuropéptidos han sido ensayados utilizando un rango de concentraciones que van desde la mayor de 10^{-6} M a la menor de 10^{-14} M en graduación de 10^{-1} M. Este rango permite estudiar por una parte los efectos que las mayores cantidades de los péptidos, a un nivel farmacológico, o bien conseguidas fisiológicamente en las proximidades de la terminación nerviosa secretora puedan tener sobre las células inmunocompetentes que nos ocupan. De hecho, otros neuropéptidos se han encontrado a niveles nanomolares en las terminaciones nerviosas como sucede con el VIP (Fahrenkrug, 1980). Las concentraciones intermedias son aquellas a las que los neuropéptidos pueden encontrarse en lugares algo más alejados de la terminación en la que se liberan y a la que pueden llegar a los fagocitos tisulares. En este rango pueden detectarse en plasma o en otros líquidos corporales (Hernanz y cols., 1989). Las concentraciones en el rango de pmolar se han encontrado para el caso de la somatostatina en líquido cerebroespinal (Reichlin, 1983). Las concentraciones menores utilizadas (10^{-14} - 10^{-13} M) suponen un rango de extrema dilución a la que normalmente no se van a encontrar esos péptidos *in vivo*. Así, en la mayoría de los trabajos existentes que estudien el efecto de neuropéptidos sobre alguna función de la respuesta inmune, se utilizan concentraciones que se encuentran entre las osciladas por nosotros. Payan y cols. (1984) utilizan concentraciones de somatostatina de 10^{-7} a 10^{-13} M y Mascards y cols. (1984) de 10^{-8} a 10^{-14} M. Goldman y cols. (1983) estudian el efecto de la neuropeptidina en el proceso fagocítico con concentraciones de 10^{-5} a 10^{-11} M. Rozengurt y cols. (1983) utilizan bombesina a concentraciones de 10^{-10} a 10^{-8} M para estudiar su efecto mitogénico.

El estudio del efecto inmunomodulador de esta familia de neuropéptidos se llevó a cabo en los dos principales tipos de células inmunocompetentes, por una parte, los macrófagos, como representantes por excelencia de las células fagocíticas, y por otro lado, los linfocitos, pieza clave en la respuesta inmune específica. Ambas son las células esenciales del sistema inmunológico y de gran importancia en el mantenimiento de la homeostasia general del organismo (Paul, 1989). También se incluyó el estudio de otras células básicas en la defensa antitumoral, las NK (Trinchieri, 1989).

Los macrófagos desempeñan funciones inespecíficas, como lo es su papel en la respuesta inflamatoria. No obstante, también desarrollan acciones específicas de colaboración con otras células inmunes, secretando factores moduladores, y así mismo actúan como células presentadoras de antígenos (APC), exponiendo en sus membranas el resultado del procesamiento del antígeno que han realizado, en unión con moléculas de histocompatibilidad, permitiendo así que tenga lugar la respuesta específica de la célula T (Delovich y cols., 1988). La mayor parte de estas funciones de colaboración o como célula efectora se basan en última instancia en la gran capacidad fagocítica de estas células (Unanue y Allen, 1987). Entre las diferentes poblaciones en

las que puede encontrarse este tipo celular, se eligió la población peritoneal en base a su fácil disponibilidad y por ser buenos representantes de otras poblaciones tisulares de macrófagos (Unanue y cols., 1989). Además, es esta una población muy estudiada por nosotros y de la que se tiene una metodología perfectamente estandarizada y diseñada por nuestro grupo (De la fuente y cols., 1985; Nuñez y cols., 1989; De la Fuente y cols., 1990).

Entre los linfocitos, los linfocitos T pueden actuar como células que al reconocer el determinante antigénico de origen exógeno presentado por la APC, proliferan y secretan citocinas que permiten la respuesta de otras células inmunes, así como ser citotóxicas frente a las células en las que reconocen un determinante antigénico extraño de origen endógeno (Hodes, 1989). Los linfocitos, objeto de estudio, fueron obtenidos de diversas fuentes. Del timo, como órgano linfóide central (Anderson, 1990), del bazo, órgano linfóide periférico pero hematopoyético en el ratón (Anderson, 1990) y de los ganglios axilares, como representativos de los órganos linfoides periféricos (Anderson, 1990).

Nuestro primer planteamiento fue estudiar los posibles efectos de los neuropéptidos elegidos sobre las funciones más representativas de cada uno de los tipos celulares comentados: macrófagos, linfocitos y células NK. En los macrófagos el proceso fagocítico, en los linfocitos su capacidad de migración y respuesta proliferativa y en las células NK su capacidad citotóxica natural.

En relación a los macrófagos se estudian todas y cada una de las diferentes etapas del proceso fagocítico que tienen lugar *in vivo*: la adherencia a sustrato como paso previo a la migración de la célula hacia el foco de infección, donde se produce la ingestión y por último la destrucción del material fagocitado. La modulación de todas estas funciones por los neuropéptidos de la familia de la BN no es conocida, aunque se tienen datos sobre la capacidad quimioatrayente de la BN en monocitos humanos (Ruff y cols., 1985) y sobre la emisión de quimioluminiscencia, como medida de la mayor capacidad de destrucción en macrófagos murinos. (Jin y cols., 1990).

En cuanto a los linfocitos, el efecto de estos neuropéptidos en su capacidad migratoria es desconocida y de forma muy puntual se ha indicado su papel estimulador de la proliferación (Krco y cols., 1986).

En cuanto al efecto de estos neuropéptidos en la función NK, según un estudio reciente en experimentos *in vitro* e *in vivo* en humanos, la BN y péptidos relacionados estimulan la actividad citotóxica natural (NK) frente a células tumorales (Van Tol y cols., 1990 y 1991). Otra actividad citotóxica, la ADCC, que se ha planteado en el presente estudio, no ha sido abordada en cuanto a su modulación por estos neuropéptidos.

Una vez comprobados los efectos de la BN, GRP y neuromedina C en las diversas funciones indicadas y el hecho de que no era necesaria la presencia de los mismos a lo largo de todo el proceso sino únicamente una incubación previa, para intentar explicar algunos de los resultados obtenidos pasamos a valorar el posible efecto de estos neuropéptidos sobre la secreción de interleucinas, en concreto de IL-1 por parte de los

macrófagos y de IL-2 por linfocitos. De hecho existía un trabajo en el que se muestra un efecto inhibitorio de la BN sobre la proliferación de células CTLL-2 inducida por IL-2 (Fink y cols., 1988).

Una vez detectados los efectos, era necesario probar la especificidad de los mismos para lo cual nos servimos de un antagonista del receptor para la BN, (Leu¹³-ψ-CH₂NH-Lou¹⁴)-BN, de demostrada acción como tal (Coy y cols., 1988). Además no se había estudiado aún la posible existencia de receptores para estos neuropéptidos en células inunes. Si bien se habían encontrado en otros sistemas (Zachary y Rozengurt, 1985; Naldini y cols., 1990; Battey y cols., 1991; Staley y cols., 1993). Por eso realizamos ensayos de unión específica con BN y GRP en macrófagos y linfocitos.

A la luz de los resultados obtenidos hasta este momento, se nos planteaba la posibilidad de que estos neuropéptidos actuaran sobre los linfocitos indirectamente, a través de las células adherentes, principalmente macrófagos. Así, realizamos ensayos en poblaciones purificadas por adherencia, que corroboraron nuestra hipótesis. Dando un paso más quisimos averiguar si esta mediación se llevaba a cabo por la interacción celular directa entre linfocito y macrófago o bien por algún factor secretado por este último.

Por último analizamos los mecanismos de acción a nivel intracelular seguidos por estos neuropéptidos y responsables de los efectos observados en las células inmunes estudiadas.

5.1. Efecto de los neuropéptidos de la familia de la bombesina sobre el proceso fagocítico de macrófagos peritoneales murinos.

Cada una de las etapas indicadas del proceso fagocítico en las que ha sido estudiado el efecto de los tres neuropéptidos de la familia de la bombesina, representa un aspecto concreto de la activación de la célula fagocítica, y pasaremos a discutir los resultados separadamente, siguiendo dichas etapas.

Como ya ha sido indicado, los neuropéptidos se han utilizado en concentraciones que van desde 10⁻⁶ M a 10⁻¹⁴ M. Este amplio rango de concentraciones incluye las utilizadas por otros autores, como Ruff y cols. (1985) que estudiaron los efectos sobre la quimiotaxis en monocitos de concentraciones de 10⁻⁸ a 10⁻¹⁴ M de BN.

De los resultados obtenidos podemos deducir, que los tres neuropéptidos estimulan *in vitro* el proceso fagocítico del macrófago sin apenas diferencias significativas entre ellos. Idénticas capacidades para la BN y el GRP ya habían sido observadas con anterioridad en la consecución de otros efectos biológicos como la secreción hormonal (Mc Donald y cols., 1983; Spindel, 1986). Este hecho sugiere que los receptores en fagocitos para GRP deben tener afinidad muy semejante para BN o neuromedina C, lo cual era esperable si tenemos en cuenta que la secuencia aminoacídica por la cual se

unen al receptor en otros sistemas es la parte común de la molécula para los tres neuropéptidos (Sinnott-Smith y cols., 1990). En algunos casos encontramos un mayor efecto para la molécula del GRP en relación a la BN y la neuromedina C, lo cual parece indicar que los diecisiete aminoácidos del extremo amino-terminal de la molécula de GRP (ausentes en los otros dos péptidos) juegan un papel importante en la activación celular. Hecho este que también ha sido corroborado por otros autores (Fletcher y cols., 1983; Guo y cols., 1987).

5.1.1 Adherencia.

Es la primera etapa fisiológica dentro del proceso fagocítico, siendo necesaria para que se produzca la extravasación o la diapedesis de las células fagocíticas desde los vasos a los tejidos inflamados (McGregor y cols., 1978; Doherty y cols., 1987).

La capacidad de adhesión de la célula fagocítica es una característica de la célula viva en la que no solo intervienen factores de tipo físico sino que se requiere la presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+} principalmente), componentes séricos, glicoproteínas y receptores, así como el citoesqueleto (Rinehart y Boulware, 1977; Springer, 1990).

Es importante la participación del propio endotelio o del sustrato tisular en la adherencia de los fagocitos. Las células endoteliales sintetizan moléculas de adhesión como ELAM-1 (molécula de adhesión de leucocitos a endotelio) e ICAM-1, ICAM-2 (molécula de adhesión intercelular) (Stauton y cols., 1989; Springer, 1990), que estando muy extendidas entre los diferentes tipos celulares permiten la unión a las mismas de las moléculas complementarias presentes en los fagocitos.

Especialmente importantes, en los fenómenos de adhesión que nos ocupan, son dos familias de glicoproteínas: las L-selectinas, y las β -integrinas que comprenden la LFA-1 o CD11a/CD18 que une ICAM-1 e ICAM-2, y el Mac-1 o CD11b/CD18 y el p150,95 o CD11c/CD18 que unen ambos ICAM-1. Estas moléculas son sintetizadas por las células fagocíticas activadas por contacto con el sustrato y se depositan sobre la membrana favoreciendo la adherencia. (Zimmerman y McIntyre, 1988; Sanchez-Madrid y cols., 1989; Stauton y cols., 1989; Zimmerman y cols., 1992).

El proceso analizado por nosotros de adhesión a sustrato plástico es semejante al fenómeno fisiológico de adhesión del macrófago al sustrato tisular que ocurre *in vivo* (Noga y cols., 1974; Haskill y cols., 1988).

Por los resultados encontrados, se deduce que los tres neuropéptidos estimulan significativamente la capacidad de adherencia de los macrófagos a sustrato, en un amplio rango de concentraciones desde 10^{-8} a 10^{-12} M. Siendo con las

concentraciones más fisiológicas (10^{-9} a 10^{-10} M) con las que se consigue la estimulación más significativa de la adherencia a todos los tiempos ensayados. Las estimulaciones mayores con los neuropéptidos se dan a los 10 minutos de incubación y las menores a los 60 minutos.

Las concentraciones más altas de los péptidos (10^{-6} a 10^{-7} M) no producen efecto probablemente debido a fenómenos de internalización de los complejos ligando-receptor con la consecuente reducción en la capacidad de unión o *down-regulation*, como se describe para la BN en monocitos (Ruff y cols., 1985), y para otros neuropéptidos, como el VIP (Ottaway, 1992).

En general los procesos inflamatorios y aquello que los promueve provocan un aumento de la capacidad de adherencia de las células fagocíticas, así los productos quimiotácticos que se encuentran en los lugares de inflamación incrementan esta capacidad (Doherty y cols., 1987).

Otros neuropéptidos biológicamente activos también estimulan la adherencia en fagocitos. Es el caso del NPY y el PYY (De la Fuente y cols., 1993a), del VIP (De la Fuente y cols., 1994), de la neurotensina y neuromedina N (De la Fuente y cols., 1993d), así como de la CCK-8s y la gastrina (Carrasco y cols., 1991). En cuanto a la forma de actuación, estos péptidos podrían comportarse de forma parecida a otros mediadores inflamatorios como el $IFN\gamma$, la IL-1 o el TNF, o como la endotoxina bacteriana, LPS, que inducen la formación de ICAM-1 en variedad de tejidos y estimulan la adhesión en linfocitos y monocitos a través de LFA-1 y Mac-1 (Bevilacqua y cols., 1987; Brevario y cols., 1988; Springer, 1990).

Este primer resultado obtenido supone que los macrófagos peritoneales están siendo activados por los neuropéptidos de la familia de la BN, hecho que por sí mismo no resultaría beneficioso para el organismo a menos que se diese acompañado de una estimulación de las otras etapas que componen el proceso fagocítico.

5.1.2. Quimiotaxis

El movimiento de la célula fagocítica a favor de un gradiente de factores químicos atrayentes es lo que se conoce por quimiotaxis, y tiene una importancia primordial en el reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio. Han sido descritos gran cantidad de factores capaces de inducir esta capacidad migratoria en fagocitos.

Estas células presentan receptores específicos para algunos de estos factores que se conocen como agentes quimioatrayentes: la fracción C5a del complemento (Fernandez y cols., 1978), leucotrienos (Ford-Hutchinson, 1980) o el péptido formilado, FMLP (Shawell y cols., 1976).

Otros muchos factores inducen la quimiotaxis de forma indirecta, favoreciendo la respuesta migratoria en favor de otro quimioatrayente, es el caso del LPS (Hugli, 1989). Por otra parte los niveles de Ca^{2+} citosólico, provenientes tanto del exterior como de los compartimentos internos de la célula, participan en el fenómeno quimiotáctico decisivamente (Gallin y cols., 1974).

También en esta segunda etapa del proceso fagocítico siguen teniendo un papel importante las glicoproteínas de adhesión que se expresan en la membrana plasmática en mayor medida en leucocitos activados quimiotácticamente (Springer y Anderson, 1986).

Por último para permitir el movimiento del fagocito debe estimularse el citoesqueleto, la maquinaria contractil de la célula que hará que los macrófagos estimulados migren más vigorosamente (Schiffmann, 1982).

Hemos estudiado en primer lugar, la modulación de la capacidad de quimiotaxis de los macrófagos peritoneales por nuestro neuropéptido, utilizando como factor quimioatrayente el FMLP, por ser uno de los mejor estudiados en cuanto a su forma de actuación y a la presencia de receptores en macrófagos. (Schiffmann y Gallin, 1979; Snyderman y Pike, 1984). Después hemos probado que los péptidos de la familia de la BN son además potentes quimioatrayentes para estas células.

La quimiotaxis en respuesta al FMLP se encuentra estimulada significativamente por los tres neuropéptidos, siendo GRP y neuromedina C los que alcanzan mayores valores de estimulación a las concentraciones más bajas, lo cual podría ser reflejo de las diferencias en cuanto a la secuencia aminoacídica con respecto a la BN.

A su vez, otros neuropéptidos estimulan la capacidad de quimiotaxis del macrófago: NPY y PYY (De la Fuente y cols., 1993a); VIP (De la Fuente y cols., 1994); la sustancia P (Ruff y cols., 1985).

Para estimar la capacidad como quimioatrayentes de estos neuropéptidos se escogieron tres concentraciones próximas a las fisiológicas y se observó un incremento del número de células que migraron por filtro, que fue muy significativo para el caso del GRP a la concentración de 10^{-10} M. La potencia como quimioatrayentes de estos neuropéptidos queda patente dado que el valor máximo conseguido con el GRP fue significativamente superior al obtenido con FMLP a 10^{-8} M, la concentración óptima en su actuación como quimioatrayente (Snyderman y Pike, 1984).

Una vez más se pone de manifiesto que si bien los 17 aminoácidos diferentes que presenta el GRP con respecto a BN y neuromedina C, no parecen claves para la unión al receptor, sí juegan un papel importante que se traduce en los efectos observados.

En cuanto a la forma de actuación a nivel intracelular, que veremos más tarde al

discutir los mecanismos de acción, podemos adelantar que ésta podría ser similar a la forma de actuación del FMLP. Este tras su interacción con el receptor en el leucocito, estimula la fosfolipasa C vía proteína G (Shelly y cols., 1989). Como resultado de lo cual se genera diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trisfosfato (IP3). El DAG puede metabolizarse y producir ácido araquidónico, que a su vez incrementa los niveles de leucotrienos y ácidos eicosatetraenoicos (HETES), que son a su vez potentes mediadores de la quimiotaxis (Shelly y cols., 1989). Además el IP3 potencia la salida de Ca^{2+} del retículo endoplasmático, el cual es directamente responsable de la capacidad migratoria de la célula (Bareis y cols., 1982) y por otra parte, la proteína quinasa C, activada por el DAG, está implicada en la regulación de la polimerización de actina (Niggli y Keller, 1991).

Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Ruff y colaboradores (1985). Estos autores demostraron que tanto el GRP como la BN eran quimioatrayentes para monocitos y células tumorales. Además es frecuente el hecho de que agentes quimioatrayentes sean fuertes estimuladores de la quimiotaxis como se ha demostrado con ciertos antibióticos (Rodríguez y cols., 1989). Si bien no siempre ocurre así, nuestro grupo ha encontrado que tanto la neurotensina como la neuromedina N estimulan la quimiotaxis de macrófagos peritoneales murinos pero no actúan como quimioatrayentes (De la Fuente y cols., 1993d).

De esta forma los neuropéptidos de la familia de la BN podrían actuar como mediadores en focos inflamatorios contribuyendo a la acumulación de fagocitos en los tejidos inflamados, de igual modo que el VIP o la sustancia P (Wiedermann y cols., 1991).

5.1.3. Fagocitosis.

El siguiente paso en el proceso fagocítico, una vez que los macrófagos han llegado al lugar donde se encuentra el agente patógeno, es la ingestión del mismo.

Nosotros analizamos la capacidad de ingestión de células vivas (*Cándida albicans*) y de partículas inertes (bolas de latex) ya que en cada caso los mecanismos implicados son diferentes.

En un primer momento se utilizó una metodología descrita en el apartado de materiales y métodos como fagocitosis en tubo que, si bien es una de las más utilizadas tras su publicación por Brune y cols., (1973) y que ha sido estandarizada para macrófagos por Nuñez y cols. (1989), resultó ser inadecuada. Los resultados obtenidos indicaban una disminución del número de cándidas ingeridas cuando los macrófagos eran incubados con concentraciones fisiológicas de bombesina. Sin

embargo estos resultados nos hicieron sospechar que podríamos estar analizando la respuesta fagocítica de una población de células no activadas por la bombesina, ya que con esta técnica los macrófagos más estimulados por el péptido quedan tan fuertemente adheridos al tubo que no es posible extraerlos del mismo para llevar a cabo el análisis fagocítico.

Por esta razón se utilizó, para estudiar la capacidad de ingestión, otra metodología alternativa y estandarizada por nosotros consistente en el empleo de placas de MIF en las que las células adheridas a las mismas podían ser visualizadas directamente al microscopio. Empleando esta nueva técnica se han realizado también estudios con otros neuropéptidos, como el VIP, observando que éste estimula la fagocitosis a concentraciones de 10^{-8} a 10^{-9} M (De la Fuente y cols., 1993b), hecho que contradecía los resultados de Litwin y cols., (1992) en macrófagos alveolares de rata, los cuales obtenían una disminución de la fagocitosis llevada a cabo por la metodología de Brune y cols. (1973).

Nuestros resultados en cuanto a la fagocitosis de partículas de latex, no muestran diferencias significativas entre los tres neuropéptidos, estimulando todos ellos esta función a concentraciones desde 10^{-8} hasta 10^{-13} M, obteniéndose de nuevo los valores estadísticamente más significativos con las concentraciones fisiológicas (10^{-9} hasta 10^{-12} M).

La incorporación de partículas inertes no parece estar mediada por receptores específicos sino a través de características iónicas y estructuras inespecíficas de membrana (Gallin, 1982), si bien algunos autores postulan la existencia en este tipo de ingestión no mediada por opsoninas, de receptores específicos aún no identificados (Silverstein y cols., 1989).

La fagocitosis de partículas inertes puede ser de gran interés a nivel fisiológico. Tal es el caso del importante papel de los macrófagos alveolares en la eliminación de partículas contaminantes que pueden introducirse por el tracto respiratorio (Golde y Hocking, 1982). De hecho curiosamente el grupo de Wiedermann (1988) que describen por primera vez la secreción de BN por células inmunes, encuentran un incremento de la secreción de este neuropéptido por macrófagos alveolares cuando estos se encuentran expuestos a sílice y carbón.

En cuanto a la fagocitosis de *Cándida albicans*, los resultados que obtuvimos fueron también de estimulación por parte de los tres neuropéptidos, y de nuevo las concentraciones fisiológicas fueron las más efectivas.

Esta estimulación de la ingestión en presencia de suero como fuente de opsoninas como es el caso de la fagocitosis de cándidas, supone la activación por parte de los tres

neuropéptidos, de los receptores para la fracción Fc de la IgG, así como de los receptores CR1 y CR3 para el complemento, que el macrófago expresa en membrana (Unanue y Allen, 1987; Silverstein y cols., 1989). Una mayor actividad y/o número de estos receptores supone una estimulación funcional de la célula fagocítica (Gandour y Walker, 1983).

Otros neuropéptidos que también estimulan la adherencia y quimiotaxis, aumentan la fagocitosis de la misma manera, como es el caso de los implicados en la regulación de los procesos inflamatorios: sustancia P (McGillis y cols., 1987) y VIP (De la Fuente y cols., 1993c) y de otros como el NPY y PYY (De la Fuente y cols., 1993a), y la neurotensina (De la Fuente y cols., 1993d).

5.1.4. Digestión.

La activación de los fagocitos y la ingestión de partículas extrañas desencadena en la célula lo que se conoce como "burst" o estallido respiratorio que se caracteriza por un aumento del consumo de oxígeno y por la generación de derivados tóxicos del oxígeno que van a constituir el principal mecanismo microbicida del macrófago. La destrucción del material fagocitado se realiza en gran medida, a través de la producción de sustancias oxidantes generadas en una primera etapa por la activación del sistema enzimático NADPH-oxidasa que forma una cadena de transporte electrónico (Mollinedo y Schneider, 1987; Klebanoff, 1980). Este complejo enzimático se sitúa en la membrana citoplasmática que pasa a formar parte de los endosomas producidos en la fagocitosis, donde se destruyen las partículas ingeridas. El anión superóxido es el primer producto que se origina en la reacción de la NADPH-oxidasa, que tiene por sustrato NADPH_2 y O_2 . Por tanto, los niveles de este anión sirven como medida de la actuación de todo el complejo enzimático (Belyakovich 1983). El anión superóxido y otros radicales libres que del mismo se derivan como el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singlete y el hidroxilo entre otros, degradan el material ingerido por los macrófagos (Mollinedo y Schneider, 1987; Commins, 1990).

Los niveles de anión superóxido se pueden cuantificar por la capacidad de éste para reducir el nitroazul de tetrazolio (NBT) convirtiéndolo, en proporción equimolar, en un formazan detectable por espectrofotometría (Bagasra y cols., 1988).

Los valores de reducción del NBT que detectamos en presencia de estímulo fagocítico (latex) son mayores que los obtenidos en ausencia del mismo, lo cual era esperable puesto que los niveles de anión superóxido se incrementan cuando el fagocito está estimulado (Mollinedo y Schneider, 1987).

En relación al efecto de los neuropéptidos estudiados, éstos estimulan tanto el

metabolismo oxidativo basal, que se analiza en las muestras incubadas en ausencia de estímulo fagocítico, como la capacidad de digestión en presencia de partículas de latex.

A partir de su formación, el anión superóxido es transformado en otros compuestos como el peróxido de hidrógeno, en reacción catalizada por la superóxido dismutasa.

Este es el primer producto del metabolismo oxidativo con potente actividad microbicida, que al combinarse con mieloperoxidasas y htauros actúa eficazmente destruyendo bacterias, virus y micoplasmas, así como células de organismos superiores (Klebanoff, 1980). Hemos valorado la producción de peróxido de hidrógeno por citometría de flujo valiendonos de un compuesto fluorescente, la 2,7-diclorofluorescina. Los resultados obtenidos son similares a los encontrados en la valoración del anión superóxido por reducción del NBT, es decir, una estimulación de los mecanismos responsables de la capacidad de digestión del macrófago en presencia de concentraciones fisiológicas de los neuropéptidos. Con el GRP se consigue una intensidad de fluorescencia intermedia entre las producidas por el PMA y el FMLP, activadores del estallido respiratorio en macrófagos (Palmlblad y cols., 1984).

Así los péptidos de la familia de la BN no solo estimulan la ingestión de partículas sino que favorecen su destrucción, imprescindible para su posterior eliminación del organismo y presentación de los determinantes antigénicos a los linfocitos (Unanue y Allen, 1987).

La producción de radicales libres ante estímulos fagocíticos, también se encuentra estimulada en presencia de otros neuropéptidos como el NPY y PYY (De la Fuente y cols., 1993a), la neurotensina (De la Fuente y cols., 1993d), el VIP (De la Fuente y cols., 1993c) y la sustancia P (Wozniak y cols., 1989).

De los resultados hasta aquí comentados podemos concluir, que los tres neuropéptidos: BN, GRP y neuromedina C estimulan a concentraciones fisiológicas todas y cada una de las etapas del proceso fagocítico de macrófagos peritoneales murinos.

5.2. Efecto sobre las funciones de linfocitos.

Los linfocitos son, sin duda importantes células efectoras y reguladoras en la respuesta inmune, por eso la posible modulación de su funcionalidad por los neuropéptidos de la familia de la BN constituía otro de los objetivos en el estudio del efecto de estos péptidos sobre el sistema inmune.

Los linfocitos desarrollan gran variedad de funciones de ellas podemos destacar

dos muy representativas: la capacidad de movimiento y la respuesta proliferativa. Así decidimos analizar ambas funciones en células linfoides incubadas con los neuropéptidos.

La movilidad de los linfocitos es esencial para la vigilancia inmunológica y selección clonal. Dentro de esta, la migración dirigida a favor de un gradiente químico o quimiotaxis permite la recuperación de células linfoides recirculantes o no desde el torrente circulatorio, así como la acumulación de las mismas en los focos de infección e inflamación. Los linfocitos B y T migran al bazo, a las mucosas y a los lugares de infección donde proliferan y se diferencian en células plasmáticas y T efectoras.

Nuestros resultados, que pasamos a comentar a continuación, prueban la existencia de una modulación positiva, como ocurría con los macrófagos, si bien a diferencia de ellos, en este caso el efecto parece ser indirecto, aunque esto lo discutiremos más adelante.

5.2.1. Quimiotaxis.

Para valorar la respuesta quimiotáctica de los linfocitos, utilizamos el mismo quimioatrayente empleado en el estudio de macrófagos, el péptido formilado (FMLP) a la concentración de 10^{-8} M. El FMLP ha sido probado como quimioatrayente para linfocitos por nuestro grupo (De la Fuente y cols., 1993b y 1993c), y otros autores sugieren la existencia de receptores para él en estas células inmunes (Shubert y Müller., 1989).

Los resultados obtenidos en cuanto al efecto de los neuropéptidos difieren según la procedencia de las células linfoides. Mientras en linfocitos peritoneales observamos un incremento significativo de la quimiotaxis en respuesta a la concentración más fisiológica (10^{-10} M), no ocurre lo mismo cuando los linfocitos proceden de órganos linfoides. Así los linfocitos obtenidos de timo ven reducida su capacidad migratoria en presencia de la concentración de 10^{-10} M de GRP; en bazo no se observan diferencias significativas con ninguna de las concentraciones empleadas; mientras que en ganglios axilares se aprecia una estimulación significativa de esta actividad con la concentración de 10^{-10} M.

Estas diferencias podrían ser debidas a las distintas poblaciones que conforman cada una de estas localizaciones linfoides in vivo. Los linfocitos T y B que componen los órganos linfoides primarios (timo y médula ósea) son continuamente exportados a la periferia localizándose principalmente en órganos linfoides secundarios, donde ven reducida su capacidad migratoria. Además esta capacidad viene también determinada ontogénicamente de forma que los linfocitos T migran más que los B, y entre los

primeros los CD4⁺ más que los CD8⁺ (Butcher, 1986; Picker y Butcher, 1992). Estos hechos se correlacionan con nuestros resultados en controles que muestran una capacidad de migración superior de los linfocitos obtenidos del timo frente a los de otras procedencias.

En cuanto a los efectos discriminativos concretos observados con los neuropéptidos estudiados, podrían tener un significado fisiológico si consideramos a éstos como mediadores inflamatorios, ya que los linfocitos procedentes de órganos secundarios convertidos en células de memoria o efectoras por exposición al antígeno, interesa que migren de forma efectiva a los lugares de inflamación (Mackay, 1991; Pitzalis y cols., 1991).

La forma de actuación de los neuropéptidos podría ser directamente sobre las moléculas expresadas en la superficie del linfocito o favoreciendo la secreción de mediadores inflamatorios en los propios linfocitos o en las células accesorias adherentes acompañantes, como macrófagos. Esta última posibilidad se vió avalada por experimentos posteriores que apuntan la necesidad de la presencia de estas células adherentes para que tenga lugar la respuesta de los linfocitos a estos neuropéptidos. Entre los posibles mediadores inflamatorios implicados, las citoquinas IFN γ y TNF α no solo incrementan la adherencia de los linfocitos a endotelio sino que favorecen la quimiotaxis in vivo tras inyección hipodérmica (Issekutz y cols., 1988 y 1989). Por otra parte otros experimentos ponen de manifiesto la implicación de las glicoproteínas de adhesión en estos procesos, así utilizando anticuerpos contra L-selectina se consigue inhibir la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal inflamada en ratón (Watson y cols., 1991), y de igual modo, anticuerpos anti-LFA-1 y anti-ICAM-1 inhiben el tráfico linfocítico (Isobe y cols., 1992).

Otros autores han encontrado a la BN capaz de estimular el tráfico linfocitario (Moore y cols., 1984), y otros neuropéptidos gastrointestinales como la neurotensina y la neuromedina N también lo hacen (De la Fuente y cols., 1993d). En cambio el VIP que estimula la quimiotaxis en macrófagos peritoneales la inhibe en linfocitos (De la Fuente y cols., 1994).

5.2.2. Proliferación.

Los factores de crecimiento son polipéptidos que regulan la proliferación y el crecimiento de las células, y que además pueden intervenir en procesos de diferenciación de las mismas. La capacidad mitogénica de los péptidos de la familia de la BN es bien conocida para líneas seleccionadas neoplásicas como fibroblastos Swiss 3T3 (Rizengurt y Sinnott-smith, 1983) y células del tumor SCLC (Weber y cols., 1985).

De nuestros resultados podemos deducir que actúan a su vez estimulando la proliferación *in vitro* de linfocitos no tumorales obtenidos de timo, bazo y ganglios axilares murinos.

Los tres neuropéptidos ejercen este efecto estimulador a la concentración más fisiológica (10^{-10} M), siendo la respuesta mayor en linfocitos obtenidos del timo frente a los obtenidos de bazo y ganglios axilares, lo cual puede deberse, como comentábamos en el caso de la quimiotaxis a las diferentes poblaciones celulares que componen uno u otros órganos. Precisamente en timo, un órgano linfóide primario, la población de células de la línea linfóide es, en su mayor parte, indiferenciada y con capacidad proliferativa (Ritter y Crispe, 1992) y en cualquier caso, la sensibilidad a las citocinas particulares o a combinaciones de ellas, varía en los diferentes estados de diferenciación de los linfocitos que se encuentran en esta localización (Cardigan y cols., 1991).

En 1960, la fitohemaglutinina (PHA) fue utilizada en estudios *in vitro* como inductor de la mitosis, correlacionándose con los fenómenos proliferativos *in vivo* (Nowell, 1960). En 1972, los linfocitos B incubados con lipopolisacáridos obtenidos de paredes bacterianas (LPS) sufrían transformación blástica, proliferaban y se diferenciaban en células secretoras de inmunoglobulinas (Andersson y cols., 1972).

Desde entonces, diversas sustancias que incluyen el grupo de las lectinas vegetales y antígenos policlonales se constituyen en potentes inductores de la proliferación para la investigación *in vitro*. La señal producida por estos mitógenos equivale a la estimulación del receptor de la célula T producida fisiológicamente por su unión al antígeno en asociación con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Weiss, 1989), estimulación que también se puede conseguir utilizando anticuerpos específicos contra dicho receptor (Van Waume y cols., 1980).

En nuestros experimentos hemos utilizado dos mitógenos, uno de ellos selectivo para linfocitos B, el LPS, y el otro selectivo para células T, la concanavalina A (Con A) (Liener y cols., 1986).

Los resultados obtenidos muestran que BN, GRP y neuromedina C inhiben muy significativamente la proliferación de linfocitos, procedentes de los tres órganos estudiados, en respuesta a los mitógenos. Resultados similares han sido encontrados por otros autores para el caso de la sustancia P que inhibe, también a concentraciones fisiológicas (10^{-9} M), entre un 30 y un 40% la proliferación inducida en esplenocitos por LPS (Pascual y cols., 1991). El VIP inhibe la respuesta linfoproliferativa a Con A y a Pokeweed (PWM) (Ottaway, 1987; Peuriere y cols., 1989). También la somatostatina

inhibe la respuesta a mitógenos (Mascards y cols., 1984; Payan y cols., 1984b; Stanisiz y cols., 1986), y hechos similares han sido puestos de manifiesto por nuestro grupo para el NPY y la CCK (De la Fuente y Del Rio, 1994).

El hecho de que los neuropéptidos de la familia de la BN actúen estimulando la proliferación e inhibiendo la respuesta a otros mitógenos es un fenómeno repetido no solo para otros neuropéptidos, como acabamos de comentar, sino para otros diversos compuestos con la peculiaridad de ser factores de crecimiento, si bien los mecanismos responsables de esta dualidad no se conocen bien. Así por ejemplo, la interleucina 4 puede estimular o inhibir el crecimiento de progenitores hematopoyéticos dependiendo de los otros factores de crecimiento que se encuentren presentes. Esto se podría explicar en base a que la unión de un péptido con su receptor específico puede alterar la distribución celular o la afinidad de unión del receptor para un segundo factor de crecimiento, independientemente de reactividades cruzadas entre ellos, lo que se conoce como transmodulación (Sporn y Roberts, 1988).

Como conclusión podemos decir que los tres neuropéptidos estimulan la funcionalidad del linfocito, si bien dependiendo de la procedencia de éste: estimulan la quimiotaxis de linfocitos obtenidos de peritoneo y ganglios axilares y la reducen en linfocitos del timo. Por otra parte estimulan la linfoproliferación espontánea e inhiben la proliferación en respuesta a mitógeno: Con A y LPS.

5.3. Efecto sobre la actividad NK y ADCC.

La citotoxicidad celular, como mecanismo de lisis mediado por leucocitos, incluye varios tipos: citotoxicidad restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), llevada a cabo por linfocitos T citotóxicos, citotoxicidad natural no restringida (NK) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o ADCC. El mecanismo de lisis tiene puntos en común en todos los casos, y básicamente consiste en el reconocimiento de la diana, su unión y posterior lisis (Bleackley y cols., 1988; Berke, 1989).

Recientemente se ha centrado la atención en la actividad NK y su activación por diversos compuestos incluyendo citocinas y productos bacterianos (Conti y cols., 1991; Moretta y cols., 1994). Las células capaces de esta lisis constituyen una subpoblación derivada de la médula ósea, que comparte antígenos de superficie comunes a linfocitos, monocitos y granulocitos, como el CD16 y el CD56 (NKH-1) pero no expresan otros antígenos de superficie característicos de la célula T como el CD3 o TCR, salvo la cadena ζ del CD3 (Anderson y cols., 1989; Phillips y cols., 1992). Por otra parte, se encuentran morfológicamente asociadas a los llamados large granular lymphocytes (LGL) (Petersen, 1988).

A parte de la actividad tumoricida que caracteriza a las células NK y que proporciona un marcador funcional para su análisis, cada vez se hacen más patentes otras funciones desempeñadas por estas células, como su papel en la resistencia natural a infecciones virales y a las producidas por otros microorganismos patógenos (Levitz y cols., 1993; Murphy y cols., 1993), o su función reguladora del sistema hematopoyético e inmune a través de la secreción de citoquinas como: interferon ($IFN\gamma$), factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$), interleucina- 1β , factor estimulador de colonias granulo-macrofágicas (GM-CSF) y factor de crecimiento transformante ($TGF\beta 1$) (Perussia, 1991).

Las bases del reconocimiento y activación de las células NK por sus células diana continúan siendo objeto de estudio. La lisis de las células tumorales dianas por las efectoras NK constituye la fase final de un proceso que comienza con el reconocimiento y formación de un conjugado entre la célula NK y la diana (Roosmund y cols., 1987) en el que intervienen moléculas de adhesión como la LFA-1, que recientemente se ha demostrado que activa además la producción de $TNF\alpha$ por las NK (Melero y cols., 1993).

Aunque la actividad NK no está restringida por el MHC, se sugirió que el nivel de expresión de dichas moléculas en la superficie de las células tumorales puede influir en su susceptibilidad o resistencia a la lisis por células NK (Harel-Bellan y cols., 1986), de forma que cuanto menor es la expresión de estos antígenos mayor es su susceptibilidad a la lisis por células NK (Karre y cols., 1986). Sin embargo posteriormente se ha demostrado que otros factores, independientemente de los antígenos de histocompatibilidad, pueden conferir resistencia a la lisis por células NK (Serrano y cols., 1989; Serrano y cols., 1990).

Los interferones son probablemente las sustancias reguladoras más importantes de la citotoxicidad natural. Con ellos otras citocinas, secretadas principalmente por macrófagos y linfocitos T son responsables de la modulación de la actividad de las células NK, como son la IL-2 y la IL-4, y el factor de crecimiento transformante (TGF) (Perussia, 1991).

En cuanto a la ADCC se caracteriza por la necesaria presencia de anticuerpos en la superficie de la célula diana que serán reconocidos por receptores específicos en la célula efectora, tal es el caso del receptor Fc para la IgG (Sissons y Oldstone, 1980). Las células natural killer, responsables de la citotoxicidad natural, pueden ser también efectores de la ADCC (Curnow y cols., 1993), y ésta se ve regulada por los mismos factores que la NK: IL-2 y IFN (γ) (Vulst y cols., 1993).

En cuanto a nuestros resultados, se observa una estimulación por los neuropéptidos de la familia de la BN de la actividad NK y ADCC tanto en muestras obtenidas del peritoneo como en leucocitos obtenidos de ganglios axilares, bazo y timo. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Van Tol y colaboradores (1990) que demuestran la estimulación de la actividad NK por BN. Así mismo otros

neuropéptidos gastrointestinales estimulan la citotoxicidad como el NPY (Nair y cols., 1993) y la sustancia P (Biennenstock y cols., 1989; Croitoru y cols., 1990).

Podemos concluir que los neuropéptidos de la familia de la BN estimulan también la actividad citotóxica natural y la citotoxicidad dependiente de anticuerpo a concentraciones fisiológicas.

5.4. Efecto sobre la secreción de factores de colaboración intercelular.

Las citocinas son factores solubles secretados por varios tipos de células inmunes, que exhiben potentes efectos reguladores sobre la respuesta inmune. La inmunorregulación desarrollada por los neuropéptidos de la familia de la BN pudiera estar mediada a través de la expresión y secreción de algunos de estos factores.

La secreción de citocinas ha sido descrita en respuesta a la incubación con otros neuropéptidos gastrointestinales, como ha sido detallado en la introducción, por recordar algún ejemplo se puede indicar que la neurotensina estimula la producción de IL-1 (Lemaire, 1988) y la sustancia P favorece la liberación de IL-1, IL-2, IL-6 y $\text{TNF}\alpha$ (Lotz y cols., 1988; Laurenzi y cols., 1990; Calvo y cols., 1992; Rameshwar y cols., 1992).

Para profundizar en el conocimiento de los efectos que la BN, GRP y neuromedina C producían en las células inmunes, nos propusimos estudiar como afectaban nuestros neuropéptidos a la secreción de dos de estas citocinas directamente implicadas en la regulación de las funciones observadas: la IL-1, producida mayoritariamente por macrófagos y que tiene su papel más relevante en la inducción de la proliferación linfoide, y la IL-2 factor autocrino secretado por el linfocito activado para estimular su proliferación. La IL-2 es además un modulador positivo de la citotoxicidad natural de linfocitos (Hoyer y cols., 1986) y también de macrófagos (Malkovsky y cols., 1987).

Los resultados observados indican un aumento en los niveles de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos que habían sido incubados con los neuropéptidos a una concentración fisiológica (10^{-10} M) que era la que había demostrado ser más eficaz en la estimulación de la respuesta proliferativa.

Este incremento en los niveles de IL-1 β , significativamente superior a controles, es comparable al obtenido en muestras de macrófagos incubadas con el mitógeno Con A, si bien el incremento en proliferación observado no se corresponde con estos resultados, ya que la estimulación de dicha función en presencia de los neuropéptidos

es significativamente menor a la que ocurre en presencia de Con A. Esto indica que además de IL-1 hay otros factores implicados en la modulación de la respuesta proliferativa que producen los neuropéptidos, como discutiremos más adelante.

Por otra parte, en muestras incubadas con los neuropéptidos además de con Con A, se observa una disminución en la producción de IL-1, con respecto a los niveles obtenidos por ambos factores por separado, neuropéptido y lectina, lo cual se corresponde con los efectos observados en proliferación de disminución de la respuesta al mitógeno en presencia de los neuropéptidos, y podría explicarse por un fenómeno de transmodulación ya previamente comentado. Así, la unión de la Con A al macrófago estaría siendo alterada por los neuropéptidos lo que provocaría una disminución en la producción de IL-1 y en la consecución de la respuesta proliferativa.

En cuanto a la liberación de IL-2 por parte de los linfocitos, ésta se vio incrementada, como cabía esperar, en presencia de Con A, pero no se modificó respecto a controles en presencia de los neuropéptidos. Este hecho puede explicar los resultados obtenidos en cuanto al efecto de los neuropéptidos sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos en ausencia de otro estímulo mitogénico, que se comentaban anteriormente. Ya que si bien los neuropéptidos incrementan los niveles de IL-1 producida por los macrófagos, en valores similares a la Con A, éstos no se traducen sin embargo en una elevación de los niveles de IL-2 producidos por los linfocitos, lo cual sería una posible causa de que observemos un discreto incremento en la proliferación no tan elevado como en el caso de la proliferación en respuesta a Con A.

También el VIP que tiene un comportamiento semejante a BN / GRP en cuanto a la linfoproliferación, es decir, que reduce la respuesta a mitógenos, se ha visto que modula negativamente la síntesis de IL-2 (Boudard y Bastide, 1991; Ganea y Sun, 1993).

El hecho de que BN, GRP y neuromedina C no modifiquen los niveles de producción de IL-2 indica también que el efecto estimulador que ejercen sobre la citotoxicidad no se encuentra mediado por esta citocina. Recientemente ha sido descubierta un nuevo factor estimulador de células NK producido, al menos, por linfocitos B, que se ha denominado IL-12 y que actúa promoviendo la síntesis de IFN γ , directamente o de forma sinérgica con IL-2 y TNF α (Tripps y cols., 1993; Naume y cols., 1993). Esta interleucina o el propio TNF α producido por macrófagos, o ambos factores, podrían ser los mediadores de la acción de estos neuropéptidos sobre la citotoxicidad y el comprobarlo es uno de los objetivos de nuestras futuras investigaciones.

En este sentido otro de los neuropéptidos más estudiados en cuanto a sus efectos

sobre el sistema inmune, la sustancia P se vió que incrementaba la actividad NK de leucocitos murinos intestinales sin observarse un incremento significativo en los niveles de IL-2 o IL-4 (Croitoru y cols., 1990).

Como conclusión podemos decir que los neuropéptidos estudiados producen un aumento de los niveles de secreción de IL-1 β por los macrófagos peritoneales pero no de la IL-2 liberada por los linfocitos.

5.5. Efecto de la preincubación con los neuropéptidos.

Los resultados obtenidos hasta este momento nos mostraban un papel modulador para los neuropéptidos de la familia de la BN sobre las células inmunes. Todos los experimentos realizados, lo habían sido manteniendo los neuropéptidos en contacto con las células durante todo el tiempo que duraba cada ensayo. Ahora nos proponíamos comprobar si era necesaria la presencia del neuropéptido durante todo el ensayo o si, por el contrario, era suficiente una incubación previa de las células con el neuropéptido para que éste ejerciera su efecto sobre las mismas.

Debíamos elegir una prueba que nos permitiera realizar una preincubación de las células con los neuropéptidos, y posteriormente lavarlas para realizar el ensayo sin tener que trasvasarlas. Esto descartaba la posibilidad de escoger las pruebas de adherencia y quimiotaxis. Además la preincubación debía de ser de una duración mínima razonable para permitir la posible transmisión de señales al interior de la célula, por esta razón, y basados en experimentos previos realizados con VIP por otros autores (Rola-Pleszczynski y cols., 1985) decidimos realizar un ensayo de preincubación durante una hora sobre la capacidad citotóxica de muestras de leucocitos obtenidas de bazo, timo y ganglios axilares. De esta forma, los leucocitos fueron incubados con tres concentraciones de GRP durante una hora previa al ensayo y a continuación se lavó la suspensión celular. Tras las cuatro horas que dura la prueba de citotoxicidad las muestras que habían sido preincubadas con el GRP mostraban porcentajes de lisis superiores a los controles y del mismo orden a los obtenidos en muestras en las que se añadió el GRP al comienzo de las cuatro horas del ensayo citotóxico y se mantuvo hasta el final.

Se deduce que no es necesaria la presencia del neuropéptido durante todo el ensayo para transmitir su efecto, siendo suficiente una incubación previa de las células.

5.6. Especificidad de los efectos observados.

Una vez observados los efectos que los péptidos de la familia de la BN estudiados, ejercen sobre la respuesta inmune, era necesario comprobar la especificidad de dichos efectos, puesto que aún no había sido descrita la presencia de receptores para estos neuropéptidos en células inmunes. Para conseguir este objetivo nos planteamos dos estrategias, cuyos resultados pasamos a discutir a continuación.

5.6.1. Utilización de un antagonista de la BN.

Recientemente se ha centrado el interés en el diseño y desarrollo de antagonistas competitivos para el receptor de la BN, sobre todo por su posible aplicación terapéutica como agentes antimitóticos en diversos tumores. Coy y colaboradores consiguieron obtener un antagonista, (Leu¹³-ψ-CH₂NH-Leu¹⁴)-BN, que exhibe una alta afinidad por el receptor de la BN comparado con otros antagonistas (100 veces superior según los propios autores), y no presenta afinidad por el receptor para la sustancia P como ocurría con otros anteriormente descritos. Además comprobaron su acción revertiendo el efecto estimulador de la BN sobre el crecimiento de células Swiss 3T3 (Coy y cols., 1988). Por todo lo anterior éste fue el antagonista escogido por nosotros para realizar los ensayos.

Elegimos las funciones más representativas de los tipos celulares estudiados para comprobar la especificidad de los efectos encontrados. Así, estudiamos la especificidad del efecto de los neuropéptidos como quimioatrayentes para linfocitos y macrófagos, usando la concentración que había resultado ser la más efectiva, 10⁻¹⁰ M. Observamos una reducción significativa del número de estas células que migraron en las muestras incubadas con BN, GRP o neuromedina C junto con el antagonista, respecto a las muestras incubadas solo con el neuropéptido. El control no se vió afectado por la incubación con el antagonista, como tampoco modificó la capacidad quimioatrayente del FMLP en muestras incubadas con ambos, FMLP y antagonista, utilizadas como un segundo control. Estos hechos corroboran por un lado, la acción específica del antagonista puesto que no afecta a la unión del FMLP con su receptor y por otro lado demuestra la acción a través de receptores específicos de los neuropéptidos puesto que se ve revertida por un antagonista del receptor para la BN.

Estos resultados se repitieron al probar la acción del antagonista en ensayos de citotoxicidad natural (NK). El efecto estimulador del GRP a la concentración de 10⁻¹⁰ M se vió revertido en presencia del antagonista.

De estos resultados se deduce que los neuropéptidos actúan sobre la funcionalidad de estas células inmunes a través de receptores específicos en la

membrana de dichas células.

5.6.2. Determinación de la presencia de receptores específicos en las células Inmunes.

Hasta ahora no han sido abordados estudios para determinar la presencia de receptores específicos para los neuropéptidos de la familia de la BN en células inmunes. Sin embargo, sí se han caracterizado en otros tipos celulares mediante ensayos de unión de radioligandos. En células pancreáticas acinares de cobaya y en dos líneas celulares endocrinas: GH4C1, de células hipofisarias de rata, y HIT de islotes de hamster (Jensen y cols., 1978; Westendorf y Schonbrun, 1983; Swope y Schonbrun, 1987). Así como en cerebro de rata (Moody y cols., 1978), y en fibroblastos de la línea Swiss 3T3 (Zachary y Rozengurt, 1985 y 1987).

Nuestros resultados muestran, en primer lugar, que la capacidad de unión al neuropéptido varía según la población celular estudiada, macrófagos o linfocitos no adherentes.

En los experimentos que se llevaron a cabo con poblaciones enriquecidas en macrófagos se observó una inhibición competitiva de la unión de los ligandos marcados, (125 I) BN o (125 I) GRP por los neuropéptidos no marcados. El análisis de Scatchard de los resultados de unión muestran la existencia de dos tipos de receptores en macrófagos, de alta afinidad $K_d=2,7\pm 0,4$ nM y $K_d=1,1\pm 0,07$ nM para BN y GRP respectivamente, y de baja afinidad $K_d=64,2\pm 7,1$ nM y $K_d=79,0\pm 8,6$ nM para BN y GRP respectivamente.

El GRP y la neuromedina C fueron capaces de inhibir la unión de la (125 I) BN a los macrófagos pero con menor potencia que la BN nativa. Del mismo modo en los experimentos con (125 I) GRP, BN y neuromedina C fueron capaces de inhibir la unión del péptido marcado con menor capacidad que el GRP, sobre todo en el caso de la BN. Estos resultados parecen estar de acuerdo con estudios recientes que indican la existencia de al menos dos tipos de receptores para estos neuropéptidos, uno de mayor afinidad por GRP y neuromedina C, y otro que presentaría mayor afinidad por otro péptido relacionado, la neuromedina B, un decapeptido que presenta discrepancias en la secuencia consenso C-terminal, careciendo entre otros, del residuo His²⁰ de la molécula del GRP, que tampoco contiene la BN. Esta heterogeneidad de receptores se ha encontrado en varias localizaciones cerebrales (Von Schreck y cols., 1989; Ladenheim y cols., 1990; Guard y cols., 1993).

Los valores de afinidad encontrados para estos receptores en macrófagos son similares a los encontrados por otros autores en otras células, como las células de

glioblastoma humano (Moody y cols. 1989; Staley y cols., 1993), en las que los autores encuentran receptores para BN de un único tipo de alta afinidad con una $K_d=2$ nM.

En cuanto a los experimentos realizados con poblaciones enriquecidas en linfocitos no adherentes mayoritariamente T (hasta un 95% de pureza), los resultados no indican la presencia de receptores ni para BN ni para GRP en estas células, en las mismas condiciones de experimentación empleadas con los macrófagos. Pudieran carecer estas células de receptores para estos neuropéptidos si bien no se descarta la posibilidad de que existan uniones de muy baja afinidad no detectadas con el tipo de metodología empleada. Por un lado, los resultados obtenidos analizando los efectos de los neuropéptidos sobre poblaciones purificadas de linfocitos, que se discutirá en el siguiente apartado, parecen apoyar la inexistencia en estas células inmunes de receptores para estos neuropéptidos, pero por otro lado y como se comentará más adelante, se observa una elevación de los niveles intracelulares de segundos mensajeros en respuesta a la incubación de los linfocitos con los neuropéptidos.

Podemos concluir que existen receptores específicos para estos neuropéptidos al menos en macrófagos por lo que los efectos observados sobre estas células inmunes son específicos.

5.7. Efecto de los neuropéptidos sobre poblaciones celulares purificadas.

Puesto que en este momento de las investigaciones la presencia de receptores era clara en macrófagos y no parecían apreciarse en linfocitos, células en las que no obstante encontramos modulación de sus funciones por los neuropéptidos objeto del presente estudio, pasamos a valorar alguna de las funciones analizadas en poblaciones purificadas.

5.7.1. Efecto sobre poblaciones purificadas de macrófagos.

La purificación de macrófagos peritoneales, se llevó a cabo en base a la capacidad de adherencia de estas células, lo cual permitió realizar los ensayos solamente en dos pruebas: la fagocitosis, que se realiza previa formación de una monocapa adherente sobre las mismas placas en las que se desarrolla posteriormente el ensayo y la citotoxicidad, que de la misma forma se realiza en placas de cultivo.

En ambos casos, la fagocitosis de latex y la citotoxicidad natural (NK) no encontramos diferencias significativas en cuanto a la estimulación de estas funciones por los neuropéptidos, en la población de macrófagos purificada frente a la población

total del peritoneo.

Estos resultados nos demuestran, por una parte, que el efecto de los neuropéptidos sobre la funcionalidad del macrófago (al menos en las dos funciones ensayadas) es directo y no mediado por otros tipos celulares, lo cual está de acuerdo con la presencia de receptores específicos para estos péptidos en estas células inmunes.

Por otro lado, la actividad NK detectada es en realidad una "NK-like" puesto que la presentan macrófagos, los cuales no son células NK aunque sí realicen actividad citotóxica natural. De hecho se han encontrado en ratón células del linaje mielóide que presentan actividad NK y se han llamado NC (citotóxicas naturales) (Berke, 1989).

5.7.2. Efecto sobre poblaciones purificadas de linfocitos.

Para determinar si los efectos moduladores de los neuropéptidos sobre la funcionalidad de los linfocitos eran directos sobre estas células o por el contrario, eran mediados a través de células adherentes accesorias como el macrófago, procedimos a realizar los ensayos funcionales en poblaciones purificadas de linfocitos no adherentes, mayoritariamente T (Thy 1+).

Estos estudios se realizaron en todas las pruebas de función linfóide: quimiotaxis, proliferación (espontánea y en respuesta a mitógeno), y citotoxicidad (natural y dependiente de anticuerpo), ya que en este caso no había ninguna dificultad metodológica que lo impidiera.

En primer lugar, en cuanto a la **quimiotaxis**, cuando las muestras purificadas procedían del peritoneo se perdió el efecto estimulador de los neuropéptidos que se siguió manteniendo en controles realizados con población peritoneal total.

Lo mismo ocurrió con muestras obtenidas de los tres órganos linfoides: bazo, timo y ganglios axilares. En este caso también se perdieron los efectos del GRP sobre la quimiotaxis: la estimulación en linfocitos de ganglios axilares y la inhibición de la quimiotaxis en linfocitos de timo. En el bazo se siguió sin observar efectos significativos.

En el estudio de la **proliferación** obtuvimos resultados semejantes. Al purificar la población linfóide de timo, bazo y ganglios axilares, perdimos el efecto mitogénico de los neuropéptidos. De igual manera, desapareció el efecto inhibitorio sobre la proliferación en respuesta al mitógeno Con A. Estos hechos apoyan los resultados discutidos en el apartado 4, en las que vemos un aumento en los niveles de IL-1 producida por macrófagos, en presencia de los neuropéptidos, pero no así en los niveles de IL-2, producida por linfocitos. Todo ello vuelve a apuntar un efecto de los

neuropéptidos sobre la proliferación linfoide mediada, al menos, a través de la secreción de IL-1 por los macrófagos.

En cuanto a la **citotoxicidad**, de nuevo los efectos estimuladores de los tres neuropéptidos sobre la citotoxicidad natural y sobre la ADCC, se perdieron cuando las muestras se encontraban deplecionadas de células adherentes. Los controles mantienen los niveles de estas actividades citotóxicas semejantes a lo encontrados con la población leucocitaria total, viéndose solamente reducidos significativamente en la NK de muestras obtenidas de ganglios axilares.

Como conclusión podemos decir que el efecto de los neuropéptidos sobre la funcionalidad de los linfocitos es indirecta y se realiza a través de las células adherentes.

5.8. Existencia de un factor mediador en el efecto de los neuropéptidos sobre los linfocitos.

Para profundizar en el tipo de mediación llevada a cabo por las células adherentes en la modulación por estos neuropéptidos sobre las funciones de los linfocitos, realizamos unos ensayos para determinar si era necesaria una interacción de las células: linfocito y adherente, o si la información se transmitía a través de algún mediador soluble producido por estas últimas, bien linfocitos adherentes, prioritariamente linfocitos B o macrófagos.

Para ello, realizamos unas pruebas de quimiotaxis con linfocitos purificados a los que añadimos los sobrenadantes de muestras peritoneales bien de células adherentes o bien de macrófagos purificados. En ambos casos las muestras fueron incubadas previamente durante 3h con el GRP (10^{-10} M).

Los resultados obtenidos, indican que no se precisa la presencia de las células adherentes durante el ensayo para observar el efecto estimulador de la quimiotaxis de linfocitos ejercida por el GRP. Sino que dicho efecto se consigue por mediación de uno o varios factores solubles que son secretados al medio por las células adherentes. Estas parecen ser macrófagos puesto que no se aprecian diferencias en la quimiotaxis de linfocitos a los que se añadieron los sobrenadantes de cultivos de la población adherente total de peritoneo o los obtenidos de macrófagos purificados.

Podemos concluir que estos neuropéptidos ejercen su acción sobre la función linfoide a través de uno o más factores solubles secretados por los macrófagos. El aislamiento y caracterización de este factor o factores será objeto de futuras

investigaciones.

5.9. Mecanismos de acción a nivel intracelular.

La regulación de las funciones celulares por los neuropéptidos depende de la transmisión de la señal efectora al interior de la célula, una vez que éstos se unen a sus receptores específicos en la membrana citoplasmática.

En los sistemas receptores se pueden identificar dos componentes funcionales: el receptor, al que se une el ligando, y el efector, que induce la respuesta. Ambos componentes pueden formar una única cadena polipeptídica, o dos entidades diferentes que necesitan acoplarse previamente para su funcionamiento.

Así se diferencian dos grandes grupos de vías de transducción de información: uno que depende de proteínas G para el acoplamiento del efector con el receptor, y otro independiente de proteínas G, en el que receptor y efector constituyen una actividad enzimática en una sola cadena polipeptídica.

Los efectos fisiológicos de un gran número y variedad de hormonas y neurotransmisores están ligados a su capacidad de activar la fosfolipasa C (PLC) por medio de la unión de sus receptores a proteínas G. La PLC es un efector enzimático que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato en inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol, que a su vez promueven la salida de Ca²⁺ de los compartimentos internos y la activación de la proteína quinasa C (PKC), respectivamente. Algunas subespecies de esta familia de proteínas G, son insensibles al bloqueo por toxina pertussis y se expresan solo en células de origen hematopoyético (Helper y Gilman, 1992). La ruta de la PLC es la vía preferentemente utilizada en la transducción de señales activadoras de la respuesta inmune en general (Michell y cols., 1992), mientras que la ruta de la adenilato ciclasa actúa como inhibidora o regulando negativamente la respuesta inmune celular (Goldstein, 1985).

En fibroblastos murinos de la línea Swiss 3T3, unas de las células mejor estudiadas en cuanto a los efectos de la BN y sus mecanismos de acción, se demostró la pertenencia del receptor de la BN al grupo de receptores dependientes de proteínas G (Fischer y Schonbrun, 1988; Sinnett-Smith y cols., 1990; Battey y cols., 1991). En estas células el efector implicado es la PLC, ya que se produce una elevación de los niveles de IP₃ y de calcio intracelular (Heslop y cols., 1986; Mendoza y cols., 1986), así como una activación de la PKC (Zachary y cols., 1986).

Resultados que implicaban a los mismos mensajeros fueron observados en la acción mitogénica de la BN sobre un tumor de mama (Patel y Screy, 1990) y en la estimulación de la secreción de insulina en células pancreáticas (Swope y Schonbrun,

1988).

La PLC también puede ser activada por receptores independientes de proteínas G, con actividad tirosina kinasa. Es el caso de los receptores de algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el derivado de plaquetas (PDGF) (Berridge, 1993) y también de un receptor para la BN hallado en las mismas células Swiss 3T3 (Cirillo y cols., 1986).

En células inmunes no habían sido investigadas las vías de transmisión de la señal a nivel intracelular por los neuropéptidos de la familia de la BN. Por esta razón nos propusimos hacerlo en los dos tipos celulares estudiados: macrófagos y linfocitos.

5.9.1. Mecanismos Intracelulares en macrófagos.

Una vez demostrada la presencia de receptores específicos para BN/GRP en la membrana de los macrófagos, nos propusimos estudiar los mecanismos intracelulares implicados en la transmisión de la señal de estos neuropéptidos.

Para ello valoramos los niveles intracelulares de los segundos mensajeros implicados en las principales rutas de transducción de señales que median los neuropéptidos: AMPc, IP₃ y PKC.

Los niveles de AMPc disminuyen a los 30 s de incubación de los macrófagos con los neuropéptidos. Esta disminución es transitoria ya que los niveles de AMPc llegan a los valores controles a los 60 s.

Por su parte, los niveles de IP₃ muestran un aumento en respuesta a la incubación con los neuropéptidos a los 60s de la incubación.

La existencia de una doble acción de los neuropéptidos y su receptor sobre la adenilato ciclasa y sobre la PLC, que se traduce en la elevación de los niveles de AMPc e IP₃, se explica dada la gran complejidad y versatilidad del mecanismo de transducción dependiente de proteínas G, que permite que una vez activada la proteína G por el receptor tras la unión de éste al neuropéptido, dicha proteína G puede activar a su vez efectores diferentes (Birnbaumer y cols., 1990; Hepler y Gilman, 1992).

Por otra parte valoramos la actividad PKC en respuesta a la incubación de los macrófagos con los neuropéptidos. La PKC se encuentra distribuida entre el citosol y la fracción particulada de la célula. Las hormonas y neurotransmisores que utilizan este mensajero intracelular estimulan la translocación de la enzima citosólica a membrana, ya que solamente la fracción unida a ésta es la forma activa, hecho este que está relacionado con cambios en la estructura secundaria de la proteína (Boscá y Moran, 1993). Esta situación depende también de la actividad metabólica de la célula, ya que en tejidos muy activos como cerebro o hígado, la enzima se encuentra en un elevado

porcentaje constantemente unida a membrana (Boscá, 1989; Díaz-Guerra y Boscá, 1990). En nuestro caso observamos una estimulación de esa actividad enzimática unida a membrana.

Estos resultados están de acuerdo con numerosos trabajos que apuntan a la ruta de los IP₃ como la preferentemente utilizada por diversos agentes estimuladores de la respuesta inflamatoria y del proceso fagocítico. Así, se demuestra que los niveles de IP₃ se elevan en macrófagos después de la adherencia a superficies de vidrio (Zabrenestzky y Gallin, 1988). También se ha demostrado que el péptido formilado actúa incrementando la quimiotaxis por esta ruta, elevando los niveles de IP₃ y de DAG (Bareis y cols., 1982; Pike y Arndt, 1988; Shelly y cols., 1989). La actividad PKC también se encuentra implicada en el desarrollo de la polaridad celular y de la movilidad inducida por FMLP (Niggli y Keller, 1993). Un aspecto importante en la capacidad de movimiento del macrófago es la activación del citoesqueleto, a este respecto el incremento en el turnover de los fosfoinositoles parece actuar como modulador del ensamblaje de actina en neutrófilos humanos (Bengtsson y cols., 1988).

Falman y cols., (1989) demuestran que la fagocitosis mediada por receptores Fc y C3b en neutrófilos humanos está asociada con un incremento en los niveles de IP₃ y DAG y propone a la protein kinasa C como efector.

En cuanto al estallido respiratorio se demuestra la necesidad de altos niveles de calcio para que sea posible, pero no sería este el único factor necesario según propone Hartiala y cols., (1987).

Por otra parte, la regulación de la expresión del mRNA de IL-1 y TNF y su síntesis por macrófagos murinos, tiene lugar vía protein kinasa C (Kovacs y cols., 1988).

Otros neuropéptidos también actúan estimulando diversos aspectos de la funcionalidad del macrófago a través de la PLC. Tal es el caso, de la sustancia P que actúa elevando los niveles de calcio citosólico y favoreciendo la formación de inositoles fosfato (Serra y cols., 1988), vía proteínas G (Shumann y Gardner 1989); del VIP que actúa estimulando la fagocitosis en macrófagos activando la PKC (De la Fuente y cols., 1993c), y del NPY que de igual forma estimula la PKC (De la Fuente y cols., 1993a). Por otra parte, una reducción de la actividad PKC en macrófagos peritoneales incubados con CCK-8, se acompaña de una menor funcionalidad de estas células en respuesta al neuropéptido (De la Fuente y cols., 1993b).

5.9.2. Mecanismos intracelulares en linfocitos.

En los linfocitos pese a no haber conseguido demostrar la existencia de receptores y a no haber observado efecto de los neuropéptidos sobre los linfocitos purificados, también nos pareció importante valorar los posibles cambios en los niveles intracelulares de segundos mensajeros.

Igual que como había ocurrido en macrófagos, observamos una disminución rápida y pasajera de los niveles de AMPc y una elevación de los de IP₃, así como un incremento en la actividad de la PKC.

Este hecho parece apoyar la existencia en estas células de receptores, si bien éstos podrían ser escasos y de baja afinidad, por lo que no habrían sido detectados por las técnicas de unión utilizadas. Los niveles de segundos mensajeros en presencia de los neuropéptidos, significativamente superiores a controles, se pueden explicar por la gran amplificación que se desencadena tras la unión del ligando al receptor en la transducción de señales mediada por proteínas G. En la mayoría de sistemas esta amplificación tiene lugar en dos etapas. En la primera se activan de diez a cien proteínas G por cada ligando unido a su receptor, y en segundo lugar, se ve afectado el recambio de miles de segundos mensajeros por cada enzima efectora que se regula (Birnbaumer y cols., 1990; Hepler y Gilman, 1992).

Estos altos niveles de IP₃ y la activación de la PKC, están implicados en la estimulación de la respuesta inmune de linfocitos, tanto en la estimulación de su capacidad de quimiotaxis (Shubert y Müller, 1989), como en la respuesta proliferativa de linfocitos T y B (Grinstein y Klip, 1989; Gardner, 1989; Hengel y cols., 1991; Rush y cols., 1992; Desal y cols., 1990).

Sin embargo en nuestro caso, esta elevación de los niveles de segundos mensajeros no se traduce en una estimulación de las funciones linfoides. Este hecho habría que explicarlo por la necesidad de una señal de activación adicional o de coestimulación en la regulación de las funciones linfoides: quimiotaxis, proliferación y citotoxicidad por estos neuropéptidos, que sería proporcionada, en el caso que nos ocupa, por los macrófagos. Esto es lo que ocurre por ejemplo, con los clones de células T inducidos por antígeno, en los que independientemente de la elevación de los niveles de calcio intracelular y de la activación de la PKC, es necesaria una señal de coestimulación producida por las células adherentes accesorias, para permitir su proliferación (Mueller y cols., 1990).

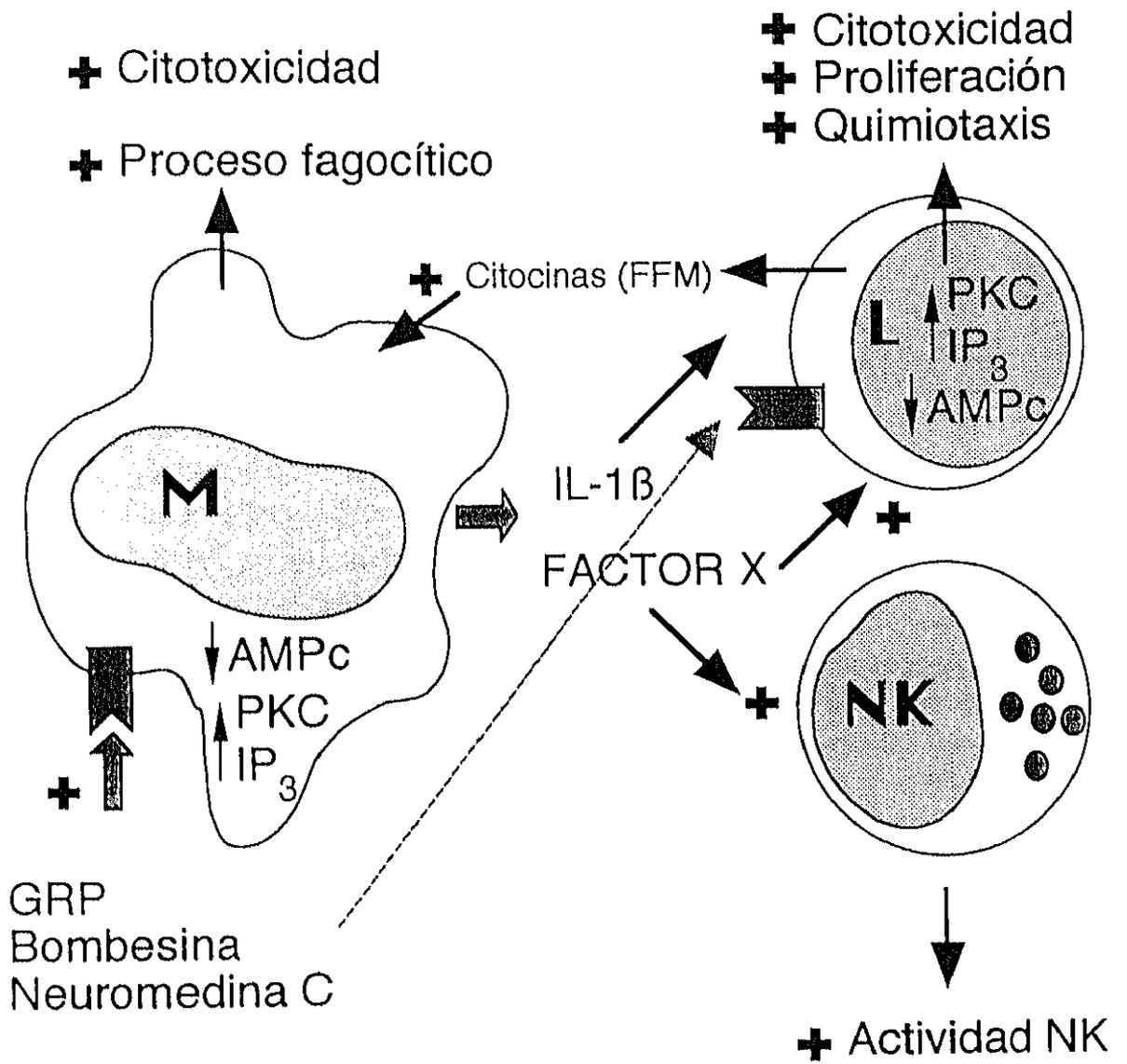
Como conclusión, estos neuropéptidos actúan sobre las células inmunes estudiadas, activando la ruta de la fosfolipasa C e inhibiendo la actividad adenilato

ciclasa, probablemente a través de proteínas G de membrana.

Nuestro trabajo confirma el papel inmunomodulador de los neuropéptidos gastrointestinales de la familia de la bombesina: BN, GRP y neuromedina C.

Estos neuropéptidos estimulan la función fagocítica de los macrófagos peritoneales murinos, uniéndose a receptores específicos en su membrana, que transmiten la señal intracelularmente a través de la activación de la PLC. Ejercen también un papel modulador positivo de la funcionalidad del linfocito en los que también activan la vía de la PLC aunque no se detectan receptores en los mismos mediante las técnicas de unión de radioligando. No obstante esa modulación en linfocitos se efectúa a través de los macrófagos, por medio de la secreción de uno o varios factores que activarían a estas células.

En la página siguiente se muestra, en esquema, el modelo propuesto para la modulación de la respuesta inmune por estos neuropéptidos.



Esquema general propuesto para la modulación de la respuesta inmune por los neuropeptidos GRP, bombesina y neuromedina ©

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos deducir que los tres neuropéptidos estudiados: bombesina, GRP y neuromedina C, modulan *in vitro* a concentraciones fisiológicas la respuesta inmune, encontrándose los mayores efectos con el GRP a una concentración 100 pM. A partir de esta conclusión general podemos concretar las siguientes conclusiones:

1. Los tres neuropéptidos estimulan todas y cada una de las etapas del proceso fagocítico de macrófagos peritoneales murinos, es decir, la adherencia a sustrato, la movilidad dirigida o quimiotaxis, actuando además como quimioatrayentes, la fagocitosis de partículas inertes y de células, así como la destrucción del material ingerido, por medio de la producción de radicales de oxígeno.

2. Los tres neuropéptidos modulan la funcionalidad de los linfocitos. Actúan como quimioatrayentes para linfocitos de peritoneo, ganglios axilares, bazo y timo y su efecto sobre la quimiotaxis de estas células depende de la procedencia de las mismas. Así, la estimulan en linfocitos obtenidos de peritoneo y ganglios axilares, no la modifican en linfocitos de bazo y la reducen en linfocitos de timo. Por otra parte, estimulan la linfoproliferación espontánea y reducen la proliferación en respuesta a mitógenos tanto de linfocitos T como de linfocitos B.

3. Los tres neuropéptidos de la familia de la BN estimulan, también, la actividad citotóxica natural y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo tanto en muestras peritoneales como en leucocitos obtenidos de timo, bazo y ganglios axilares.

4. Los neuropéptidos estudiados producen un aumento de los niveles de secreción de IL-1 β por los macrófagos peritoneales pero no de la IL-2 liberada por los linfocitos.

5. No es necesaria la presencia de los neuropéptidos para producir los efectos moduladores, siendo suficiente una incubación previa de las células con los mismos.

6. Existen receptores específicos para estos neuropéptidos al menos en

macrófagos, de dos tipos, de alta y baja afinidad, por lo que los efectos observados sobre estas células inmunes son específicos, hecho también corroborado por la reversión de dichos efectos encontrada en presencia de un antagonista de la BN.

7. El efecto de los neuropéptidos sobre la funcionalidad de los linfocitos es indirecta y se realiza a través de las células adherentes.

8. Estos neuropéptidos ejercen su acción sobre la función linfóide a través de algún factor soluble secretado por los macrófagos.

9. A nivel intracelular, estos neuropéptidos actúan sobre las células inmunes estudiadas, activando la ruta de la fosfolipasa C, con elevación de los niveles de IP_3 y activación de la proteína quinasa C, e inhibiendo la actividad adenilato ciclasa, produciendo una reducción de AMPc.

Como conclusión final, podemos afirmar que los neuropéptidos estudiados estimulan *in vitro* la funcionalidad de los macrófagos murinos, uniéndose a receptores específicos en su membrana, que transmiten la señal intracelularmente a través de la activación de la PLC, dando lugar a la secreción de factores que modulan la función de los linfocitos y células NK, actuando como señal de activación para dichas células inmunes.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABE E., MIYAURA C., SAKAGAMI H. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4990-4994 (1981).
- ABRASS C.K., O'CONNOR S.W., SCARPACE P.J., ABRASS I.B. Characterization of the β -adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. *J. Immunol.* 135: 1338-1341 (1985).
- ADACHI N., YAMAGUCHI K., MIYAKE Y., HONDA S., NAGASAKI K., AKIYAMA Y., ADACHI I., ABE K. Parathyroid hormone-related protein is a possible autocrine growth inhibitor for lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 1088-1093 (1990).
- ADAMS F., QUESADA J.R., GUTTERMAN J.V. Neuropsychiatric manifestations of human leukocyte interferon therapy in patients with cancer. *J. Am. Med. Assoc.* 252:938-941 (1984).
- ADO A., GOLDSTEIN M.M., KRAVCHENKO S.A., FOMINOVA T.I. Muscarinic cholinergic B lymphocyte receptors during immune response in mice. *Byull. Eksp. Biol. Med.* 101: 587-589 (1986).
- ADER R., FELTEN D., COHEN N. Interactions between the brain and the immune system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 561-602 (1990).
- ALIAKBAR J., SREEDHARAN S.P., TURK C.W., GOETZL E.J. Selective localization of VIP and substance P in human eosinophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148:1440 (1987).
- ALVAREZ-MON M., KEHRL J.H., FAUCI A.S. A potential role for adrenocorticotropin in regulating human B-lymphocytes functions. *J. Immunol.* 135:3823-3826 (1985).
- ANASTASI A., ERSPAMER V., BUCCI M. Isolation and structure of bombesin and alytesin: two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia* 27: 166 (1971).
- ANDERSON A.O. Structure and organization of the lymphatic system. In *Immunophysiology. The role of cells and cytokins in immunity and inflammation*. Ed. Oppenheim J.J. y Stevach E.M. Oxford University Press. N.Y. (1990).
- ANDERSON P., CALIGIURI M., RITZ J., SCHLOSSMAN S.F. CD3-negative natural killer

- cells express d TCR as part of a novel molecular complex. *Nature* 341:159-162 (1989).
- ANDERSSON J., SJOBERS O., MOLLER G. Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccharides. *Eur. J. Immunol.* 2: 349-352 (1972).
- ANDREIS P.G., NERI G., BELLONI A.S., MAZZOCCHI G., KASPRZAK A., NUSSDORFER G.G. Interleukin-1 β enhances corticosterone secretion by acting directly on the rat adrenal gland. *Endocrinology* 129: 55-57 (1991).
- ATWEH S.F., GRANYHACK J.J., RICHMAN D.P. A cholinergic receptor site on murine lymphocytes with novel binding characteristics. *Life Sci.* 35: 2459-2469 (1984).
- AUDHYA T., JAIN R., HOLLANDER C.S. Receptor-mediated immunomodulation by corticotropin-releasing factor. *Cell Immunol.* 134: 77-82 (1991).
- BAGASRA O., HOWEEDY A., KAJDASCY-BALLA A. Macrophage function in chronic experimental alcoholism. Modulation of surface receptors and phagocytosis. *Immunology* 65: 405-409 (1988).
- BAREIS D.L., HIRATA F., SCHIFFMAN E., AXELROD J. Phospholipid metabolism, calcium flux and the receptor mediated induction of chemotaxis in rabbit neutrophils. *J. Cell. Biol.* 93: 690-697 (1982).
- BAR-SHAVIT Z., GOLDMAN R., STABINSKY Y., GOTTLIEB P., FRIDKIN-TEICHBERG V.I., BLUMBERG S. Enhancement of phagocytosis: a newly found activity of substance P residing in its N-terminal tetrapeptide sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94: 1445-1451 (1980).
- BAR-SHAVIT Z., TERRY S., BLUMBERG S., GOLDMAN R.- Neurotensin- macrophage interaction: specific binding and augmentation of phagocytosis. *Neuropeptides* 2:325 (1982).
- BATHENA S.J., LOUIE J., SCHECHTER G.P., REDMAN R.J., WAHL L., REICANT L.- Identification of human mononuclear leukocytes bearing receptors for somatostatin and glucagon. *Diabetes*.30:127-131 (1981).
- BATTEY J.F., WAY J.M., CORJAY M.H., SHAPIRA H., KUSANO K., HARKINS R., WU J.M., SLATTERY T., MANN E., FELDMAN R.I. Molecular cloning of the

- bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:395-399 (1991).
- BELLINGER D.L., ACKERMAN K.D., FELTEN S.Y., LORTON D., FELTEN D.L. Noradrenergic sympathetic innervation of thymus, spleen and lymph nodes: aspects of development, aging and plasticity in neural immune interactions. In *Interactions among central nervous system, neuroendocrine and immune systems*. Ed. Hadden J.W., Masek K., Nistico G. Pythagora Press. Roma. Milan. (1989).
- BELYACOVICH A. Tetrazolium method for the study of the catalytic properties of oxidoreductases in cellular organelles immobilized on glass surface. *Annals Biochem.* 131: 404-409 (1983).
- BERNTON E.W., BEACH J. E., HOLADAY J. W., SMALLRIDGE R.C., FEIN H.G. Release of multiple hormones by direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 238:519-521 (1987).
- BERCZI I. Immunoregulation by neuroendocrine factors. *Dev. Comp. Immunol.* 13:329-341 (1989).
- BERKE G. Functions and mechanisms of lysis induced by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. In *Fundamental Immunology*. Ed. Paul W.E. Raven Press. N.Y. (1989).
- BERRIDGE M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325 (1993).
- BESEDOVSKY H.O., DEL REY A.E., SORKIN E. Immune-neuroendocrine interactions. *J. Immunology* 135 (2): 270-754 (1985).
- BETANCUR C., LLEDO A., BORRELL J., GUAZA C. Corticosteroid regulation of IL-1 receptors in the mouse hippocampus: effects of glucocorticoid treatment, stress, and adrenalectomy. *Neuroendocrinology* 59: 120-128 (1994).
- BEVILACQUA M.P., STENGELIN S., GIMBRONE MA.Jr., SEED B.-Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243:1160-1164(1989).

- BHALLA A.K., AMENTO E.P., CLEMENS T.L. Specific high affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57: 1308-1310 (1983).
- BIENNENSTOCK J., CROITORU K., ERNST P.B., STANISZ A.M. Nerves and neuropeptides in the regulation of mucosal immunity. *Plenum Publ. Corp.* pp 19-26 (1989).
- BLALOCK J.E., HARP C. Interferon and adrenocorticotrophic hormone induction of steroidogenesis, melanogenesis and antiviral activity. *Arch. Virol.* 67: 45-49 (1981).
- BLALOCK J.E., SMITH E.M. Human leukocyte interferon: potent endorphin-like opioid activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 472-478 (1981).
- BLALOCK J.E. The immune system as a sensory organ. *J. Immunology* 132:1067-1070 (1984).
- BLALOCK J.E., HARBOUR-McMENAMIN D., SMITH E.M. - Peptide hormones share by the neuroendocrine and immunologic systems. *J. Immunol.* 135:858-61(1985a).
- BLALOCK J.E., JOHNSON H.M., SMITH E.M., TORRES B.A. Enhancement of the in vitro antibody response by thiotropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 30-34 (1985b).
- BLEACKLEY C.R., CORRINE G.L., HEVELE C., SHAW J. A molecular-genetic analysis of cytotoxic T lymphocyte function. In *Cytotoxic T cells: biology and relevance to disease. Annals N.Y. Acad. Sci.* 532: 359-366 (1988).
- BODY J.J., GLIBERT F., NEJAI S., FERNANDEZ G., VAN LANGENDONCK A., BORKOWSKI A. Calcitonin receptors on circulating normal human lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71: 675-679 (1990)
- BONNET M., LESPINATE G., BURTIN C. Histamine and serotonin suppression of lymphocytes response to phytohemagglutinin and allogeneic cells. *Cell. Immunol.* 83: 280-291 (1984).
- BOSCA L. Lack of correlation between translocation and biological effects mediated by

- protein kinase C: an appraisal. *Immunol. Today* 10: 223-224 (1989).
- BOSCA L., MORAN F. Circular dichroism analysis of ligand-induced conformational changes in protein kinase C. Mechanism of translocation of the enzyme from cytosol to the membranes and its implications. *Biochem. J.* 290: 827-832 (1993).
- BOST K.L., SMITH E.M., WEAR L.B., BLALOCK J.E. Presence of ACTH and its receptor on a B lymphocyte cell line: a possible autocrine function for a neuroendocrine hormone. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 1:23-27 (1987).
- BOUDARD F., BASTIDE M. Inhibition of mouse T cell proliferation by cGRP and VIP: Effects of these neuropeptides on IL-2 production and cAMP synthesis. *J. Neurosci. Res.* 29:29 (1991).
- BOURNE H.R., LICHTENSTEIN L.M., MELMON K.L., HENNEY C.S., WEINSTEIN Y., SHEARER G.M. Modulation of inflammation and immunity by cAMP: receptors for vasoactive intestinal hormones and mediators of inflammation regulate many leukocyte functions. *Science* 184: 19-28 (1974).
- BOXER L.A., ALLEN J.M., BAEHNER R.L.- Disminish polymorphonuclear leukocyte adherence. *J. Clin. Invest.* 66:268(1980).
- BOYDEN S.Y. The chemotaxis effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 115: 453-456 (1962).
- BOYUM A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21: 77-82 (1968).
- BREVIARIO F., BERTOCCHI F., DEJANA E., BUSSOLINO F. IL-1 Induces adhesion of polymorphonuclear leukocytes to cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* 141: 2291-3397 (1988).
- BROWN M., RIVIER J., KOBAYASHI R., VALE W. Neurotensin-like and BN-like peptides: CNS distribution and actions. *Gut Hormones* (ed. Bloom S.R.) p.p. 550-558. Churchill Livingstone, Edimburg. (1978).
- BRUNE K., CHIMID L., GLATT M., MINDER B. Correlation between antimicrobial activity and peroxidase content of leukocyte. *Nature* 245: 209-210 (1973).

- BURCLEY L.A., PUTNAM CH.W., RUSSELL D.H.- Prolactin is a tumor promoter in rat liver. *Life Sciences* (1985).
- BUTCHER E.C. The regulation of lymphocyte traffic. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 128: 85-122 (1986).
- CALVO C.F., CHAVANEL G., SENIK A. Substance P enhances IL-2 expression in activated human-T cells. *J. Immunol.* 148:3498-3504 (1992).
- CALVO J. R., MOLINERO P., JIMENEZ J., GOBERNA R., GUERRERO J.M. Interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) with rat peritoneal cells. *Peptides* 7: 177-181 (1986).
- CAMBRONERO J.C., RIVAS F.J., BORRELL J., GUAZA C. Interleukin-1 β induces pituitary adrenocorticotropin secretion: evidence for glucocorticoid modulation. *Neuroendocrinology* 55: 648-654 (1992a).
- CAMBRONERO J.C., RIVAS F.J., BORRELL J., GUAZA C. Interleukin-2 induces corticotropin-releasing hormone release from perfused rat hypothalamus: influence of glucocorticoids. *Endocrinology* 131: 677-683 (1992b).
- CANH P.Q., ROUX C., PILLOT J., BOUVET J.P. Delineation between T and B suppressive molecules from human seminal plasma. *AJR* 64-69 (1990).
- CARDIGAN S.R., HAYDAY A.C., BOTTOMLY K. Cytokins in T-cell development. *Immunology Today* 12: 239-245 (1991).
- CARRASCO M., HERNANZ A., DE LA FUENTE M. Modulation by cholecystokinin and gastrin of adherence and phagocytosis of human blood neutrophils. *J. Clin. Invest* (1991).
- CARR D.J.J., BOST K.L., BLALOCK J.E. The production of antibodies which recognize opiate receptor of murine leukocytes. *Life Sci.* 42, 2615-2624, (1988).
- CHEN W.C., VAYUVEGULA B., GUPTA S. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ mediated inhibition of human B cell differentiation. *Clin Exp. Immunol.* 69: 639-646 (1987).
- CIRILLO D.M., GAUDINO G., NALDINI L., COMOGLIO P.M. Receptor for bombesin with associated tyrosine kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* 6: 4641-4649 (1986).
- COMMINS L.M., LOEGERING D.J., LUDOWITZ D.W. Effect of phagocytosis of erythrocyte ghosts on macrophage phagocytic function and hydrogen peroxide

- production. *Inflammation* 14 (1990).
- CONTI P., DEMPSEY R.A., REALE M., BARBACANE R.C. PANARA M.R., BONGRAZIO M., MIER J.W. Activation of human natural killer cells by lypopolisaccharide and generation of interleukin-1alfa, beta , tumor necrosis factor and interleukin-6. Effect of IL-1 receptor agonist. *Immunology* 73: 450-456 (1991).
- COSTA O., BOUTET C., SAUVAGE P., MICHEL J.P., DASCHAUX P. Age-dependent LH and FSH effect on the proliferation of women's peripheral blood lymphocytes In vitro. *Int J. Immunopharmacol.* 12: 821-827 (1990).
- COY D.H., HEINZ-ERIAN P., JIANG N-Y., SASAKI Y., TAYLOR J., MOREAU J-P., WOLFREY W.T., GARDNER J.D., JENSEN R.T. Probing peptide backbone function in bombesin: a reduced peptide bond analogue with potent and specific receptor antagonist activity. *J. Biol. Chem.* 263: 5056-5060 (1988).
- COY D.H., WANG L-H., JIANG N-Y., JENSEN R.T. Short chain bombesin pseudopeptides with potent bombesin receptor antagonist activity in rat and guinea pig pancreatic acinar cells. *Eur. J. Pharmacol.* 190: 31-38 (1990).
- CROITORU K., ERNST P.B., BIENENSTOCK J., PADOL I., STANISZ A.M. Selective modulation of natural killer activity of murine intestinal intraepithelial leukocytes by the neuropeptide substance P. *Immunology* 71: 196-201 (1990).
- CURNOW S.J., GLENNIE M.J., STEVENSON G.T. The role of apoptosis in antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Immunology Immunother* 36:149-155 (1993).
- DANEK A.M., O'DORISIO S., O'DORISIO M., GEORGE J.M. Specific binding sites for vasoactive intestinal peptide on nonadherent peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 131: 1173-77 (1983).
- DAVILA D.R., BRIEF S., SIMONI J., HAMMER R.E, BRINSTRE R.L., KELLEY K.W. Role of growth hormone in regulating T-dependent immune events in aged nude and transgenic rodents. *J. Neurosci. Res.* 18: 108-116 (1987).
- DE LA FUENTE M. Changes in the macrophage function with aging. *Comp. Biochem. Physiol.* 81A(4): 935-938 (1985).
- DE LA FUENTE M., MARTIN I, ORTEGA E. Changes in the fagocytic function of

- peritoneal macrophages from old mice after strenuous physical exercise. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 13(4): 189-198 (1990).
- DE LA FUENTE M., BERNAEZ I., DEL RIO M., HERNANZ A. Stimulation of murine peritoneal macrophage functions by neuropeptide Y and peptide YY. Involvement of protein kinase C. *Immunology* 80: 259-265 (1993a).
- DE LA FUENTE M., CAMPOS M., DE LA CUADRA B., CARRASCO M., DEL RIO M. Sulfated cholecystokinin-8 (CCK-8s) an inhibitor peptide for chemotaxis of murine and human phagocytes and lymphocytes: intracellular mechanisms. *Eur. J. Neurosci. Suppl.* 6: 256 (1993b).
- DE LA FUENTE M., DELGADO M., DEL RIO M., MARTINEZ C., HERNANZ A., GOMARIZ R.P. Stimulation by vasoactive intestinal peptide (VIP) of phagocytic function in rat macrophages. Protein kinase C involvement. *Reg. Peptides* 481:345-353 (1993c).
- DE LA FUENTE M., GARRIDO J.J., ARAHUETES R.M., HERNANZ A. Stimulation of phagocytic function in mouse macrophages by neurotensin and neuromedin N. *J. Neuroimmunol.* 42,97-104 (1993d).
- DE LA FUENTE M., DELGADO M., DEL RIO M., GARRIDO E., LECETA J., HERNANZ A., GOMARIZ R.P. Vasoactive intestinal peptide modulation of adherence and mobility in rat peritoneal lymphocytes and macrophages. *Peptides*. (en prensa) (1994).
- DE LA FUENTE M., DEL RIO M. The modulation of neuropeptides on immune function decreases during aging. Workshop on *Deterioration, Stability and Regeneration of the brain during normal Aging*. Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones. Madrid, (1994).
- DEL GOBBO V., LIBRI V., VILLANI N., CALIO R., NISTICO G. Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 5: 567-571 (1989).
- DELOVICH T.L., SEMPLE J.W., PHILLIPS M.L. Influence of antigen processing on immune responsiveness. *Immunol. Today* 9: 216-218 (1988).
- DESAI D.M., NEWTON M.E., KADLECEK T., WEISSA. Stimulation of the phosphatidylinositol pathway can induce T-cell activation. *Nature* 348: 66-69

(1990).

DIAZ-GUERRA M.J., BOSCA L. Lack of translocation of protein kinase C from the cytosol to the membranes in vasopressin-stimulated hepatocytes. *Biochem. J.* 269: 163-168 (1990).

DOCKRAY, G.J., VAILLANT, C., AND WALSH, J.H. The neuronal origin of bombesin-like immunoreactivity in the rat gastrointestinal tract. *Neuroscience* 4, 1561 (1979).

DOHERTY D.E., HASLETT C., FONNESEN M.G., HENSON P.M.-Human monocyte adherence: a primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate adherence to human endothelium. *J.Immun.* 138:1762-71(1987).

EDWARDS C.K., GHIASUDDIN S.M., YUNGER L.M., LORENCE R.M., ARKINS S., DANTZEER R., KELLEY K.W. In vivo administration of recombinant growth hormone or gamma interferon activates macrophages: enhanced resistance to experimental *Salmonella typhimurium* infection is correlated with generation of reactive oxygen intermediates. *Infect. Immunol.* 60:2514-2521 (1992).

ERSPAMER V. Discovery, isolation and characterisation of Bombesin-like peptides. *Annals N. Y. Acad. Sci.* 547:3 (1988).

FELDMAN R.D., HUNNINGHAKE G.W., McARDLE W.L. β -adrenergic receptors mediate suppression of IL-2 receptors in human lymphocytes. *J. Immunol.* 139: 3355-3359 (1987).

FELTEN D.L.; CARLSON ; OLSCHOWCA ; LIVNAT - Noradrenergic and peptidergic innervation in lymphoid tissue. *J. Immunol.*135:7555-655.(1985).

FERNANDEZ H.N., HENSON P.M., OTANI A., HUGLI T.E.- Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylotoxins. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis *in vitro* and under simulated *in vivo* conditions. *J.Immunol.*120:109-115 (1978).

FERRARA A., McMILLEN M.A., SCHAEFER H.C., ZUCKER K.A., GOLDBERGER J.R., MODLIN I.M. Cholecystokinin mediated calcium signals in peripheral human blood monocytes. *FASEB J.* 3:A998 (Abstract) (1989).

FILLION M.P., PRUDHOMME N., HAOUR F., FILLION G., BONNET M., LESPINATS G., MASEK K., FLEGEL M., CORVALIA N., LAUNAY J.M. Hypothetical role of the

- serotonergic system in neuroimmunomodulation. *Interactions among CNS, Neuroendocrine and Immune systems*. Ed. Hadden J.W., Masek K. y Nistico G. Pythagora Press, Roma, Milan. (1989)
- FINCH R.J., SREEDHARAN S.P., GOETZL E.J. High-affinity receptors for VIP on human myeloma cells. *J. Immunol.* 142:127-131 (1989).
- FINK R., EHRHARDT R., DANCYGIER H. Bombesin and its analogues inhibit IL-2-induced proliferation of CTLL-2 cells. *Reg. Peptides* 23: 323-330 (1988).
- FISCHER J.B., SCHONBRUNN A. The bombesinreceptor is coupled to a guanine nucleotide-binding protein which is insensitive to Pertussis and Cholera toxins. *J. Biol. Chem.* 263: 2808-2816 (1988).
- FLETCHER D.R., SHULKES A., BALDIN P.H.D., HARDY K.J. The effect of atropine on bombesin and gastrin-releasing peptide, pancreatic polypeptide and neurotensin release in man. *Reg. peptides* 7:31-40 (1983).
- FONTANA A., KRISTENSEN F., DUBSR., GEMSA D., WEBER E. Production of PGE2 and IL-1 like factors by culture astrocytes and C6 glioma cells. *J.Immunol.* 129: 2413-2419 (1982).
- FORD-HUTCHINSON A.W., BRAY M.A., DOIG M.U., SHIPLEY M.E., SMITH M.J.H.- Leukotriene B, a potent chemokinetic and agregating substance release from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286:264-65 (1980).
- FROELICH C.J., BANKHURST A.D.- The effect of b-endorphin on natural cytotoxicity and antibody dependent cellular cytotoxicity. *Life Sciences* 35:261 (1984)
- GAILLARD R.C., TURNILL D., SAPPINO P., MULLER A.F. Tumor necrosis factor alfa inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinology* 127(1): 101-106 (1990).
- GALLIN J.I., ROSENTHAL A.S. The regulatory role of divalent cations in human granulocyte chemotaxis. Evidence for an association between calcium exchanges and microtubule assembly. *J. Cell Biol.* 62: 594-609 (1974).
- GANEA D., SUN L. Vasoactive intestinal peptide downregulates the expression of IL-2 but not of IFNg from stimulated murine T lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 47: 147-158 (1993).

- GANDOUR D., WALKER M.- Macrophase cell cycling: phagocytosis. *J Immunol.* 13:1108-12 (1983).
- GARRIDO J.J., ARAHUETES R.M., HERNANZ A., DE LA FUENTE M. Modulation by neurotensin and neuromedin N of adherence and chemotaxis capacity of murine lymphocytes. *Regulatory Peptides* 41,27-37 (1992).
- GIORDANO M., PALERMO M.S. Melatonin induced enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Pineal Res.* 10: 117-121 (1991).
- GOLDE D.W., HOCKING W.G. Monocyte and macrophage development. In *Advances in host defense mechanisms*. Ed. Gallin J.I. y Fauci A.S. Raven Press N.Y. (1982).
- GOLDMAN R., BAR-SHAVIT Z., ROMEO D.- Neurotensin modulates human neutrophil locomotion and phagocytic capability. *FEBS letters* 159:63.(1983).
- GOLDSTEIN I.H. Células fagocíticas: funciones quimiotácticas y efectoras de los macrófagos y los granulocitos. *Inmunología básica y clínica*. Ed. D.P.Stiles, H.M. Funderberg, J.D. Stobo y J.V. Wells. pp 114-118 (1985).
- GOMARIZ R.P., LORENZO M.J., CACICEDO L., VICENTE A., ZAPATA A.G. Demostration of immunoreactive VIP and somatostatin in rat thymus. *Brain Behaviour and Immunity* 4: 151-156 (1990).
- GOMARIZ R.P., DE LA FUENTE M., HERNANZ A., LECETA J. Occurrence of vasoactive intestinal peptide (VIP) in lymphoid organs from rat and mouse. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 650:13-18. (1992).
- GOMARIZ R.P., DELGADO M., NARANJO J.R., MELLSTROM B., TORMO A., MATA F., LECETA J. VIP gene expression in rat thymus and spleen. *Brain Behaviour and Immunity* 7: 271-278 (1993).
- GOMARIZ R.P., LECETA J., GARRIDO E., GARRIDO T., DELGADO M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA expression in rat B and T lymphocytes. *Reg. Peptides* 50: 177-184 (1994).
- GOULDING N.S. Y GUYRE P.M. Glucocorticoids, lipocortin and the immune response. *Current Opinion in Immunology* 5, 108-113 (1993).

- GRAFF R.J., LAPPE M.A., SHELL G.D. The influence of the gonads and adrenal glands on the immune response to skin grafts. *Transplantation* 7: 105 (1983).
- GREEN B.R., WEGMAN T.G. Beyond the immune system: the immunotrophic role of T-cell in organ regeneration. *Progress in Immun.* 101(6): 1100 (1984).
- GREENSTEIN B.D., FITZPATRICK F.T.A., KENDALL M.D., WHEELER M.J. Regeneration of the thymus in old male rats treated with a stable analogue of LHRH. *J. Endocrinol.* 112: 345-350 (1987).
- GROSSMAN C.J., SHOLITON C.J., ROSELLE G.-Estradiol regulation of thymic lymphocytes function in the rat: mediation by serum thymic factors. *J. Steroid Biochem.* 16:683.(1982).
- GROSSMAN C.J.- Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Rev.*5(3):435-55.(1984).
- GUARD S., WATLING K.J., HOWSON W. Structure-activity requirements of bombesin for gastrin-releasing peptide and neuromedin B-preferring bombesin receptors in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 240: 177-184 (1993).
- GUAZA C., BORRELL J. Prostaglandins and CRF release from invitro perfused rat hypothalamus by Interleukins. Effects of dexamethasone treatment. *Eur. J. Neuroscience Suppl.* 6 pg 254 (1993).
- GUERRERO J.M., PRIETO J.C., ELORZA F.L., RAMIREZ R., GOBERNA R. Interaction of vasoactive intestinal peptide with human blood mononuclear cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 21:151-160 (1981).
- GUO Y-S., MOK L., COOPER C.W., GREELEY G.H., THOMPSON J.C., SINGH P. Effect of gastrin-releasing peptide analogues on gastrin and somatostatin release from isolated rat stomach. *Am J. Physiol.* 253: G206-G210 (1987).
- GUYRE P.M. Y MUNK A. Glucocorticoid actions on monocytes and macrophages. *Antiinflammatory steroid action, basic and clinical aspects.* Academic Press. Cap 9: 199-225 (1989).
- HADDED E.E., MASHALY M.M. In vivo effects of TRH, T3 and cGH on antibody and T and B lymphocytes proliferation in immature male chickens. *Immunol. Invest.* 20(7):557-568 (1991).

- HAEFELI W.E., BARGETZI M.J., STARNES H.F., BLASCHKE T.F., HOFFMAN B.B. Evidence for activation of the sympathetic nervous system by recombinant human IL-1B in humans. *J. Immunotherapy* 13: 136-140 (1993).
- HAFSTROM I., GYLLENHAMMAR H., PALBLAD J., RINGERTZ B. Substance P activates and modulates neutrophil oxidative metabolism and aggregation. *J. Rheumatology* 16 (8): 1033-1037 (1989).
- HAREL-BELLAN A., QILLET A., MARCHIOL C., DeMARS R., TURSZ T., FRADELIZI D. Natural killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 688-692 (1986).
- HARTUNG H.P., TOYKA K.V. Activation of macrophages by substance P: induction of oxidative burst and tromboxane release. *Eur. J. Pharmacol.* 89:301-305 (1983).
- HARTUNG H.P., WOLTERS K., TOYKA K.V. Substance P: binding properties and studies on cellular responses in guinea pig macrophages. *J. Immunol.* 135:3856 (1986).
- HASKILL S., JOHNSON CH., EIERMAN D., BECKER S., WARREN K. Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes. *J. Immunol.* 140: 1690-1694. (1988).
- HELDERMAN J.H.- Role of insulin in the intermediary metabolism of the activated thymic-derived lymphocyte. *J. Clin. Invest.* 67:1636 (1981).
- HELLSTRAND K., HERMODSSON S. Role of serotonin in the regulation of human natural killer cell cytotoxicity. *J. Immunol.* 139: 869-875 (1987).
- HENGEL H., ALLIG B., WAGNER H., HEEG K. Dissection of signals controlling T cell function and activation: H7, an inhibitor of protein kinase C, blocks induction of primary T cell proliferation by suppressing interleukin IL-2 receptor expression without affecting IL-2 production. *Eur. J. Immunol.* 21: 1575-1582. (1991).
- HEPLER J.R., GILMAN A.G. G proteins. *Trends in Bio. Sci.* 17: 383-387 (1992).
- HERBERT J-M. Protein kinase C: a key factor in the regulation of tumor cell adhesion to the endothelium. *Biochem. Pharmacology* 45: 527-537 (1993).
- HERNANZ A., MUELAS G., BORBUJO J. Plasma neuropeptide pattern in acute

- idiopathic urticaria. *Int. Arch. Appl. Immunol.* 90: 198-200 (1989).
- HERNANZ A. Characterization and distribution of bombesin-like peptides in the rat brain and gastrointestinal tract. *Biochem. Cell. Biol.* 69: 1142-1145 (1990).
- HESLOP J.P., BLAKELEY D.M., BROWN K.D., IRVINE R.F., BERRIDGE M.J. Effects of BN and insulin on inositol (1,4,5)trisphosphate and inositol (1,3,4)trisphosphate formation in Swiss 3T3 cells. *Cell* 47:703-709 (1986).
- HODES R.J. T-cell-mediated regulation: help and suppression. In *Fundamental Immunology*. Ed. Paul W.E. Raven Press. N.Y. (1989)
- HOMO-DELARCHE F., DARDENNE M. The neuroendocrine-immune axis. *Springer Semin. Immunopathol.* 14:221-238 (1993).
- HOOSEIN N.M., KIENER P.A., CURRY R.C., BRATTAIN M.G. Evidence for autocrine growth stimulation of cultured colon tumor cells by gastrin/cholecystokinin-like peptide. *Exp. Cell. Res.* 186: 15-21 (1990).
- HOYER M., MEINEKE T., LEWIS W., ZWILLING B., RINEHART J. Characterization and modulation of human lymphokine (interleukin-2) activated killer cell induction. *Cancer Res.* 46: 2834-2838 (1986).
- HUGLI T.E.- Chemotaxis. *Current Opinion in Immunol.* 2:19-27 (1989).
- HURME M., SILJANDER P., ANTTILA H. Regulation of IL-1 β production by glucocorticoids in human monocytes. The mechanism of action depends on the activation signal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 1383-1389 (1991).
- IRWIN M., BROWN M., PATTERSON T., HAUGER R., MASCOVICH A., GRANT I. Neuropeptide Y and natural killer cell activity: findings in depressing and Alzheimer caregiver stress. *FASEB J.* 5: 3100-3113 (1991).
- IRWIN M., HAUGER R., BROWN M. Central corticotropin-releasing hormone activates the sympathetic nervous system and reduces immune function-increased responsivity of the aged rat. *Endocrinology* 131, 1047-1053 (1992).
- ISHIOKA C., YOSHIDA A., KIMATA H., MIKAWA H. Vasoactive intestinal peptide stimulates immunoglobulin production and growth of human B cells. *Clin. Exp. Immunol.* 87:504-508 (1992).

- ISOBE M., YAGITA H., OKUMURA K., IHARA A. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* 255: 1125-1127 (1992).
- ISSEKUTZ T.B., STOLTZ J.M., MEIDE P. Lymphocyte recruitment in delay-type hypersensitivity. The role of γ IFN. *J. Immunol.* 140: 2989-2993 (1988).
- ISSEKUTZ T.B., STOLTZ J.M. Stimulation of lymphocyte migration by endotoxin tumor necrosis factor, and interferon. *Cell. Immunol.* 120: 165-173 (1989).
- JANKOVIC B.D., ISAKOVIC. Neuroendocrine correlates with immune response. *Int. Arch Allergy Immunol.* 45: 360-384. (1973).
- JENSEN R.T., MOODY T.W., PERT C.B., RIVIER J.E., GARDNER J.D. Interaction of bombesin and litorin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 6139-6143 (1978).
- JIN, G-F., GUO, Y-S., HOUSTON, C.W. Bombesin: an activator of specific *Aeromonas* antibody secretion in rat intestine. *Dig. Dis. Sci.* 34, 1708-1712 (1989).
- JIN, G-F., GUO, Y-S., SMITH, E.R., HOUSTON, C.W. The effect of bombesin-related peptides on the phagocytic function of mouse phagocytes in vitro. *Peptides*, 11, 393-396 (1990).
- JOHANSSON O., SANDBERG G. Effect of the neuropeptides beta-MSH, neurotensin, NPY, PHI, somatostatin and substance P on proliferation of lymphocytes in vitro. *Acta Physiol. Scand.* 137,107-111 (1989).
- JOHNSON H.M., SMITH E.M., TORRES B.A., BLALOCK J.E. Neuroendocrine hormone regulation of the in vitro antibody response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4171-4174 (1982).
- JOHNSON H.M., TORRES B.A., SMITH E.M., DION B.A., BLALOCK J.E. Regulation of lymphocyte IFN γ production by corticotropin. *J. Immunol.* 132: 246-250 (1984).
- KAMMER G.M. The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response. *Immun. Today* 9:222-29 (1988).
- KARRE K., LJUNGGREN H.G., PIONTEK G., KIESSLING R. Selective rejection of H-2 deficient lymphoma variants suggest alternative immune defense strategy. *Nature*

- 319: 675-678 (1986).
- KAVELAARS A., BALLIEUX R.E. Y HEIJNEN C.J. The role of interleukin-1 in the CRH and AVP induced secretion of b-endorfin by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunology* 142; 2238-2242 (1989).
- KAY N., ALLEN J., MORLEY J.E.- Endorphines stimulate normal human peripheral blood lymphocyte natural killer activity. *Life Sciences* 35:53 (1984).
- KHAN I.A., BHARDWAJ G., MALLA N., WATTAL C., AGARWAL S.C. Effects of serotonin on T lymphocyte proliferation in vitro in healthy individuals. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 81: 378-380 (1986).
- KHAN M.M., SANSONI P., SILVERMAN E.D., ENGLEMAN E.G., MELMON K.L. β -adrenergic receptors on human suppressor, helper and cytotoxic lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 35: 1137-1142 (1986).
- KLEBANOFF S.J. Oxygen metabolism and toxic properties of phagocytes. *Ann. Internal Med.* 93: 480-489 (1980).
- KRKO C.J., GORES A., GO V.L.W. Gastrointestinal regulatory peptides modulate mouse lymphocyte functions under serum-free conditions in vitro. *Immunol. Invest.* 15: 103-111 (1986).
- KRUEGER J.M., OBAL F., OPP M., JOHANNSEN L., CADY A.B., TOTH L. Immune response modifiers and sleep. *Interactions among CNS, Neuroendocrine and Immune systems*. Ed. Hadden J.W., Masek K. y Nistico G. Pythagora Press, Roma, Milan. (1989)
- KRUGER T.E., SMITH L.R., HARBOUR D.V, BLALOCK J.E. Thyrotropin: an endogenous regulator of the in vitro immune response. *J. Immunol.* 142:744-747 (1989).
- LADENHEIM E.E., JENSEN R.T., MANTEY J.E., McHUGH P.R., MORAN T.H. Receptor heterogeneity for bombesin-like peptides in the rat central nervous system. *Brain. Res.* 537: 233 (1990).
- LAURENZI M.A., PERSSON M.A.A., DALSGAARD C.J., RINGDEN O. The neuropeptide substance P stimulates production of interleukin 1 in human blood monocytes: activated cells are preferentially influenced by neuropeptides. *Scand. J. Immunol.* 31, 529-533 (1990).

- LEMAIR I. Neurotensin enhances IL-1 production by activated alveolar macrophages. *J. Immunol.* 140: 2983-2988 (1988).
- LEMIRE J.M., ADAMS J.S., KERMANI V. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ suppress human T helper/induced lymphocyte activity in vitro. *J. Immunol.* 134: 3032-3035 (1985).
- LETTERIO J.J., COUGHLIN S.R., WILLIAMS L.T. Pertussis toxin-sensitive pathway in the stimulation of c-myc expression and DNA synthesis by bombesin. *Science* 234:1117-1119 (1986).
- LEVITZ S.M., DUPONT M.P. Phenotypic and functional characterization of human lymphocytes activated by IL-2 to directly inhibit growth of *Cryptococcus neoformans* in vitro. *J. Clin. Invest.* 91: 1490-1498 (1993).
- LEW W., OPPENHEIM J.J., MATSUSHIMA K. Analysis of the suppression of IL-1 α and IL-1 β production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by glucocorticoid hormone. *J. Immunol.* 140: 1895-1902 (1988).
- LEWIS T. The blood vessels of the human skin and their responses. Ed. Shaw and sons. London (1927).
- LIEBERMAN A.P., PITHA P.M., SHIN H.S., SHIN M.L. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neutrophilic virus. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 86: 6348-6352 (1989).
- LIEBOW C., CREAN D.H., SCHALLY A., MANG T.S. Peptide analogues alter the progression of premalignant lesions, as measured by protofrin fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1897-1901 (1993).
- LIENER I.E., SHARON N., GOLDSTEIN I.J. Ed. *Lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine*. Academic Press. Londres, (1986).
- LITWIN D.K., WILSON A.K., SAID S.I. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) inhibits rat alveolar macrophage phagocytosis and chemotaxis in vitro. *Reg. Peptides* 40:63-74 (1992).
- LOLAIT S.J., LIM A.T.W., TOH B.H., FUNDER J.W. Immunoreactive beta-endorphin in a subpopulation of mouse spleen macrophages. *American Society Clin. Invest.* 73:277-80 (1984).

- LOPEZ-GONZALEZ M.A., CALVO J.R., OSUNA C., GUERRERO J.M. Interaction of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulation by vasoactive intestinal peptide and activation of GMP production. *J. Pineal Res.* 12: 97-104 (1992a).
- LOPEZ-GONZALEZ M.A., CALVO J.R., OSUNA C., RUBIO A., GUERRERO J.M. Melatonin potentiates cyclic AMP production stimulated by vasoactive intestinal peptide in human lymphocytes. *Neurosci. Lett.* 136: 150-152 (1992b).
- LOTZE M. T., FRANA L.W., SHARROW S.O., ROBB R.J., ROSENBERG S.A. In vivo administration of purified human interleukin-2. I. Half-life and immunologic effects on the Jurkat cell line derived interleukin-2. *J. Immunol.* 134: 157-166 (1985).
- LOTZ M., VAUGHAN J.H., CARSON D.A. Effects of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 241: 1218 (1988).
- LYGREN I., REVHANG A., BURHOL P.G., GIERCKYSKY K.E., JENSEN T.G. Vasoactive intestinal peptide and somatostatin in leukocyte. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 44:347 (1984).
- MACKAY CR. T-cell memory: the connection between function, phenotype and migration pathways. *Immunol. Today* 12: 189-192 (1991).
- MADJIC O., LISZKA K., LUTZ D. Myeloid differentiation antigen defined by a monoclonal antibody. *Blood* 58: 1127 (1981).
- MAESTRONI G.J.M., CONTI A., PIERPAOLI W. Role of the pineal gland in immunity. I. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J. Neuroimmunol.* 13: 19-30 (1986).
- MAESTRONI G.J.M., CONTI A., PIERPAOLI W. Role of the pineal gland in immunity. II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin. Exp. Immunol.* 68: 384-391 (1987).
- MAESTRONI G.J.M., CONTI A., PIERPAOLI W. Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology* 63: 465-469 (1988).

- MALINSKY W., KULBERG M., NORDTROM O., BARTFAI T. Muscarinic receptors and receptor mediated actions on rat thymocytes. *J. Neuroimmunol.* 17: 265-274 (1988).
- MALKOVSKY M., LOVELAND B., NORTH M., ASHERSON G.L., GAO L., WARD P., FIERS W. Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature* 325: 262-265 (1987).
- MANDLER R.N., BIDDISON W.F., MANDLER R., SERRATE S.A.- b-endorphin augments the cytolytic activity and interferon production of natural killer cells. *J. Immunol.* 136:934-39 (1986).
- MANOLAGAS S.C., HUSTMYER F.G., YU X.P. Immunomodulating properties of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Kidney Int.* 38: S9 (1990).
- MANSO G., BAKER A.J., TAYLOR I.K., FÜLLER R.W. In vivo and in vitro effects of glucocorticosteroids on arachidonic acid metabolism and monocyte function in nonasthmatic humans. *European Respiratory Journal* 5, 712-716 (1992).
- MARASCO W.A., SHOWELL H.J., BECKER E.L.- Substance P binds to the formylpeptid chemotaxis receptor on the rabbit neutrophil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99:1065-72 (1981).
- MARCHETTI B., GUARCELLO V., TRIOLO G., MORALE M.C., FARINELLA Z., SCAPAGNINI U. Lutelizing hormone-releasing hormone (LHRH) as natural mesenger in neuro-immune endocrine communications. *Interactions among CNS, Neuroendocrine and Immune systems*. Ed. Hadden J.W., Masek K. y Nistico G. Pythagora Press, Roma, Milan. (1989).
- MASCARDS R.N., BARTON R.W., SHERLINE P.-Somatostatine has an antiproliferative effect on Concavalin A-activated rat thymocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 33:131 (1984).
- McDONALD T.J., H. JORNVAL, G. NILSSON, M. VAGNE, M. GHATEI, S.R. BLOOM AND V. MUTT. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90: 227 (1979).
- McDONALD T.J., GHATEI M.A., BLOOM S.R., ADRIAN T.E., MOCHIZUKI T., YANAIHARA C., YANAIHARA N. Dose-response comparisons of canine plasma gastroenteropancreatic hormone responses to bombesin and the porcine gastrin-releasing peptide. *Reg. Peptides* 5: 125-137 (1983).

- McGILLIS J.D., ORGANIST M.L., PAYAN P.G. Substance P and immunoregulation. *Fed. Proc.* 46: 196-201 (1987).
- McGREGOR R.- Comparative adherence of granulocytes to endothelial monolayers and nylon fiber. *J. Clin. Invest.* 61:697-702 (1978).
- McMILLEN M.A., FERRARA A., SCHAEFFER H.C., GOLDBRING J.R., ZUCKER K.A., MODLIN I.M. Cholecystokinin mediates a calcium signal in human peripheral blood mononuclear cells and in a co-mitogen. *Ann. NY. Acad. Sci.* 594: 399-402 (1990).
- MELERO I., BALBOA M.A., ALONSO J.L., YAGUE E., PIVEL J.P. & SANCHEZ-MADRID F., LOPEZ-BOTET M. Signaling through the LFA-1 leukocyte integrin actively regulates intercellular adhesion and tumor necrosis factor- α production in natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 23: 1859-1865 (1993).
- MELONI F., BERTOLETTI R., CORSICO A., DIFAZIO P., CECCHETTI M., GIALDRONIGRASSI G. Bombesin/gastrin-releasing peptide levels of peripheral mononuclear cells, monocytes and alveolar macrophages in chronic bronchitis. *Int. J. Tissue Reactions. Exp. and Clin. Aspects* 14: 195-201 (1992).
- MENDOZA S.A., SCHNEIDER J.A., LOPEZ-RIVAS A., SINNETT-SMITH J.W., ROZENGURT E. Early events elicited by bombesin and structurally related peptides in quiescent Swiss 3T3 cells. Changes in Na⁺ and Ca²⁺ fluxes, Na⁺, K⁺ pump activity and intracellular pH. *J. Cell. Biol.* 102:2223-2233 (1986).
- MERRILL J. E. Effects of Interleukin 1 and tumor necrosis factor α on astrocytes, microglia, oligodendrocytes and glial precursors in vitro. *Dev. Neurosci.* 13: 130-137 (1991).
- MERRILL J. E. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and related cytokines in brain development. *Normal and Pathological Dev. Neurosci.* 14:1-10 (1992).
- MEYER R.J., HAGGERTY R.J. Streptococcal infections in families: factors altering individual susceptibility. *J. Pediat.* 29:339 (1962).
- MICHELL R.H., CONROY L.A., FINNEY M., FRENCH P.J., BUNCE C.M., ANDERSON K., BAXTER M.A., BROWN G., GORDON J., JENKINSON E.J., LORD J.M., KIRK C.J., OWEN J.J.T. Inositol lipids and phosphates in the proliferation and differentiation of lymphocytes and myeloid cells. *Ciba Foundation Symposium* 164.

- Ed. J. Wiley & sons Ltd. N.Y. (1992).
- MIHAS A.A., GIBSON R.G., MIHAS T.A. Effects of gastrointestinal hormonal peptides on the transformation of human peripheral lymphocytes. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 73: 123-126 (1991).
- MINAMINO N., KANGAWA K., MATSUO H. Neuromedin C: a bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119: 14 (1984).
- MOLLINEDO F., SCHNEIDER D.L. Membrane fusion as a mechanism for activation of the superoxide generating system in human neutrophils. Redox functions of the eukariotic plasma membrane. Ramirez (ed.) *CSIC Madrid* (1987).
- MOODY T.W., PERT C.B., RIVIER J., BROWN M.R. Bombesin: specific binding to rat brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5372-78 (1978).
- MOODY T.W., PERT C.B., GAZDAR A.F., CARNEY D.N., MINNA J.D. High levels of intracellular bombesin characterize human small cell lung carcinoma. *Science* 214: 1246-1248 (1981).
- MOODY T.W., MAHMOUD S., STALEY J., NALDINI L., CIRILLO D., SOUTH V., FELDEER S., KRIS R. Human glioblastoma cell lines have neuropeptide receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide. *J. Mol. Neurosci.* 1: 235-242 (1989).
- MOODY T.W., CUTTITA F. Growth factors and peptide receptors in small cell lung cancer. *Life Science* 52: 1161-1173 (1993).
- MOORE T.C. Modification of lymphocyte traffic by vasoactive neurotransmitter substances. *Immunology* 52: 511-518 (1984).
- MOORE T.C, SPRUCK C.H., SAID S.I. Depression of lymphocyte traffic in sheep by vasoactive intestinal peptide (VIP). *Immunology* 64: 1-4 (1988).
- MOORE R.M., OSMAND A.P., DUNN J.A., JOSHI J.G., KOONTZ J.W., ROUSE B.T. Neurotensin regulation of macrophage colony-stimulating factor-stimulated in vivo myelopoiesis. *J. Immunol.* 142:2686-94 (1989).
- MOORTHY D., ZIMMERMAN S.- Human leukocyte responses to an endurance run. *Eur.J.Appl.Physiol.* 38:271(1978).

- MORETTA L., CICCONE E., MINGARI M.C., BIASSONI R., MORETTA A. Human natural killer cells: origin, clonality specificity and receptors. *Adv. Immunol.* 55: 341-380 (1994)
- MUELLER D.L., JENKINS M.K., CHIODETTI L., SCHWARTZ R.H. An intracellular calcium increase and protein kinase C activation fail to initiate T cell proliferation in the absence of a costimulatory signal. *J. Immunol.* 144: 3701-3709 (1990).
- MUNROE J.S. Progesteroids as immunosuppressive agents *J. Reticuloendothel. Sci.* 9: 361 (1971).
- MURPHY J.W., HIDOIRE M.R., WONG S.C. Direct interactions of human lymphocytes with the yeast-like organism *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin Invest.* 91: 1553-1566 (1993).
- NAGY E., BERCZI I., FIESEN H.G. Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. *Acta Endocrinol.* 102: 351-357 (1983).
- NAIR M.P.N., SCHWARTZ S.A. Immunoregulatory effects of corticosteroids on natural killer and antibody dependent cellular cytotoxic activities of human lymphocytes. *J. Immunology* 132:2876-2882 (1984).
- NAIR M.P.N., SCHWARTZ S.A., WU K., KRONFOL Z. Effect of neuropeptide γ on natural killer activity of normal human lymphocytes. *Brain, Behavior and Immunity* 7:70-78 (1993).
- NALDINI L., CIRILLO D., MOODY T.W., COMOGLIO P.M., SCHLESSINGER J., KRIS R. Solubilization of the receptor for the neuropeptide gastrin-releasing peptide (Bombesin) with functional ligand binding properties. *Biochemistry* 29: 5153-5160 (1990).
- NAUME B., JOHNSEN A-C., ESPEVIK T., SUNDAN A. Gene expression and secretion of cytokines and cytokine receptors from highly purified CD56⁺ natural killer cells stimulated with Interleukin-2, Interleukin-7 and Interleukin-12 *Eur. J. Immunol.* 23: 1831-1838 (1993).
- NIGGLI V., KELLER H. On the role of protein kinases in regulating neutrophil actin association with the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 266: 7927-7932 (1991).
- NIGGLI V., KELLER H. Inhibition of chemotactic peptide-induced development of cell

- polarity and locomotion by the protein kinase C inhibitor CGP 41 251 in human neutrophils correlates with inhibition of protein phosphorylation. *Exp. Cell Res.* 204: 346-355 (1993).
- NOGA S.J., NORMAN S.J., WEINER R.S. Methods in laboratory investigation: Isolation of guinea pigs monocytes and Kurloff cells. Characterization of monocyte subsets by morphologic, cytochemistry and adherence. *Lab. Invest.* 51: 244-251 (1974).
- NOWELL G.H., CRUSE J.M., LEWIS R.E. Detection of β -adrenergic receptors on mouse peritoneal macrophages by binding to insolubilized hormone preparation. *Fed. Proc.* 40:81a (1981).
- NOWELL P.L. Phytohemagglutinin: an indicator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. *Cancer Res.* 20: 462-466 (1960).
- NUMAO T., AGRAWAL D.K. Neuropeptides modulate human eosinophil chemotaxis. *J. Immunol.* 149: 3309-3315 (1992).
- NUÑEZ R.M., RODRIGUEZ A.B., BARRIGA C., DE LA FUENTE M. In vitro and in vivo effects of Imipenem on phagocytic activity of peritoneal macrophages. *APMIS* 97: 879-886 (1989).
- O'DORISIO M.S., O'DORISIO T., COTLAND S., BAKERZAK S.P. Vasoactive intestinal polypeptide as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 96: 666-672 (1985).
- O'DORISIO M.S. Biochemical characteristics of receptors for vasoactive intestinal polypeptide in nervous, endocrine and immune systems. *Fed. Proc.* 46: 192-195 (1987).
- O'DORISIO M.S., SHANNON B.T., FLESHMAN D.J., CAMPOLITO L.B. Identification of high affinity receptors for vasoactive intestinal peptide on human lymphocytes. *J. Immunol.* 142: 3533-3536 (1989).
- OTTAWAY C.A., GREENBERG G.R. Interaction of vasoactive intestinal peptide with mouse lymphocytes: specific binding and modulation of mitogen responses. *J. Immunol.* 132: 417-423 (1984).
- OTTAWAY C.A. In vitro alterations of receptors for vasoactive intestinal peptide changes the in vivo localization of mouse T-cells. *J. Exp. Med.* 160: 1054-1069 (1985).

- OTTAWAY C.A. Selective effects of vasoactive intestinal peptide on the mitogenic response of murine T cells. *Immunology* 62: 291-299 (1987).
- OTTAWAY C.A. Receptors for vasoactive intestinal peptide on murine lymphocytes turn over rapidly. *J. Neuroimmunol.* 38:241-254 (1992).
- PALMBLAD J., GYLLENHAMMAR H., LINDGREN J.A., MALMSTEN C.L. Effects of leucotriens and F-Met-Leu-Phe on oxidative metabolism of neutrophils and eosinophils. *J. Immunol.* 132: 3041-3045 (1984).
- PANG C.S., PANG S.F. High affinity specific binding of 2-(125)iodomelatonin by spleen membrane preparations of chicken. *J. Pineal Res.* 12: 167-173 (1992).
- PASCUAL D.W., BOST K.L. Substance P production by P338D1 macrophages: a possible autocrine function for this neuropeptide. *Immunology* 71: 52-56 (1990).
- PASCUAL D.W., MCGHEE J.R., KIYONO H., BOST K.L. Neuroimmune modulation of lymphocyte function-I. Substance P enhances immunoglobulin synthesis in lipopolysaccharide activated murine splenic B cell cultures. *Int. Immunol.* 3(12):1223-1229 (1991).
- PATEL K.V., SCHREY M.P. Activation of inositol phospholipid signalling and Ca²⁺ efflux in human breast cancer cells by bombesin. *Cancer Res.* 50: 235-239 (1990).
- PAUL W.E. The immune system: an introduction. In *Fundamental Immunology*. Ed. Paul W.E. Raven Press. N.Y. (1989).
- PAYAN D.G., BREWSTER D.R., GOETZL E.J.- Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J. Immunol.* 131:1613 (1983).
- PAYAN D.G., BREWSTER D.R., MISSIRIAN-BASTIAN A.- Substance P recognition by a subset of human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 74:1532-39 (1984a).
- PAYAN D.G., HESS C.A., GOETZL E.J. Inhibition of somatostatin of the proliferation of T lymphocytes and Molt-4 lymphoblast. *Cell. Immunology* 84: 433-438 (1984b).
- PAYAN D.G., LEVINE J.D., GOETZL E.J. Modulation of immunity and hypersensitivity by sensory neuropeptides. *J. Immunology* 132: 1601-1610 (1984c).

- PEDERSON O., BECK-NIELSEN H., HEDING L.- Increased insulin receptors after exercise in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N.Eng.J.Med.* 302(16):886-92 (1980).
- PERNOW B.- Substance P. *Pharmacol.Rev.* 35:85-141 (1983).
- PERRY H.M., CHAPPEL J.C., BELLORIN FONT E., TAMAO J., MARTIN K.J., TEITELBAUM S.L. Parathyroid hormone receptors in circulating human mononuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 259: 5531-5535 (1984).
- PERUSSIA B. Lymphokine activated killer cells. Natural killer cells and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 49-55 (1991).
- PETERSEN C.L. Natural killer cells. *Canadian J. Med. Technol.* 51:25-29 (1988).
- PEURIERE S., SUSINI C., ESTEVE J-P., VAYSSE N., ESCOULA L. Dual effect of vasoactive intestinal peptide on the mitogenic response of rabbit spleen lymphocytes. Reprinted from: *Reg. Peptides. Elsevier Sci. Publ. B.V. Biomed. Div.* (1989).
- PHILLIPS J. H. , HORI T, NAGLER A, BHAT N, SPITS H., LANIER L. Ontogeny of human natural killer (NK) cells. Fetal Nk cells mediate cytotoxic function and express cytoplasmic CD 3 ϵ , δ proteins. *J. Exp. Med.* 175: 1055-1066 (1992).
- PICKER L.J. Mechanisms of lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.* 4: 277-286 (1992a)
- PICKER L.J., BUTCHER E.C. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Ann. Rev. Immunol.* 10: 561-591 (1992b).
- PITZALIS C., KINGSLEY G.H., COVELLI M., MELICONI A.M., PANAYI G.S. Selective migration of the human helper-inducer memory T cell subset: conformation by in vivo cellular kinetic studies. *Eur. J. Immunol.* 21: 369-376 (1991).
- PLOTNIKOFF N.P., MILLER G.C.- Enkephalins as Immunomodulators. *Int.J.Immunopharmacol.* 5:437 (1983).
- POLLAK J.M., BLOOM S.R., HOBBS S., SOLCIA E., PEARSE A.G.E. Distribution of bombesin-like peptide in human gastrointestinal tract. *Lancet* 1: 1109-1110 (1976).

- PROVEDINI D.M., TSOUKAS C.D., DEFTOS L.J. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes. *Science* 221: 1181-1183 (1983).
- PUNNONEN J., HEINONEN P.K., TEISALA K., KUJANSUU E., JANSEN C.T., PUNNONEN R. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 33: 2 (1992).
- RAMESHWAR P., GASCON P., GANEA D. Immunoregulatory effects of neuropeptide. Stimulation of IL-2 production by substance P. *J. Neuroimmunol.* 37:65-74 (1992).
- RINEHART J., BOULWARE T. Microfilaments and microtubules functions in human monocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 90: 733-743 (1977).
- RITCHIE J.C., OWENS M., O'CONNOR L., NEMEROFF C. Measurement of ACTH and CRF immunoreactivity in adrenals and lymphocytes. *Sci. Neurosci. Abstr.* 12:296-305 (1986).
- RITTER M.A., CRISPE I.N. The Thymus .Ed. D.Male. Oxford University press. N.Y. (1992).
- ROBERTS A.J., PANJA A., BROLIN R.E., EBERT E.C. Human Intraepithelial lymphocytes. Immunomodulation and receptor binding of vasoactive intestinal peptide. *Digest. Dis. Sci.* 36: 341 (1991).
- ROBERTSON A., RAMERAR C., POTTS J., GIBBS M.- The effect of strenuous physical exercise on circulating blood lymphocytes and serum cortisol levels. *J. Clin. Immun.* 5:53 (1981).
- ROLA-PESZCZYNSKI M.R., BOLDUC D., ST. PIERRE S. The effect of vasoactive intestinal peptide on human natural killer cell function. *J. Immunol.* 135:2569-2573 (1985).
- ROMANO T.A., FELTEN S.Y., FELTEN D.L., Olchowca J.A. Neuropeptide Y Innervation of the rat spleen: another potential immunomodulatory neuropeptide. *Brain Behavior and Immunity* 5,116 (1991).
- ROOSTH J., POLLARD R.N., BROWN S.L., MEYER W.J. Cortisol stimulation by recombinant Interferon α 2. *J. Neuroimmunol.* 12:311-316 (1986).
- ROOZEMUND R.C., MEVISEN M., URLI D.C., BONAVIDA B. Effect of altered

- membrane structure on NK cell-mediated cytotoxicity. III. Decreased susceptibility to natural killer cytotoxic factor (NKCF) and suppression of NKCF release by membrane rigidification. *J. Immunol.* 139: 1739-1746 (1987).
- ROSCETTI G., AUSIELLO C.M., PALMA C., GULLA P., RODA L.G. Enkephalin activity on antigen-induced proliferation of human peripheral blood mononucleate cells. *Int J. Immunopharmac.* 10 (7): 819-823 (1988).
- ROSZMAN T.L., JACKSON R.J., CROSS M.J., TITUS W.R., MARKESBERRY W.R., BROOKS H. Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function. *J. Immunol.* 135: 769-772 (1985).
- ROTH K.A., EVANS C.J., LORENZ R.G., WEBER E., BARCHAS J.D., CHANG J-K. Identification of gastrin releasing peptide-related substances in guinea pig and rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112, 528 (1983).
- ROTH M.S., DRAZENOVICH K.A., JEFREAY B.S., BARBOSE B.S., DINARELLO C.A., COBB C.F. Direct stimulation of adrenal cortex by Interleukin-1. *Surgery* 102:140-146 (1987).
- ROZENGURT E., SINNETT-SMITH J. Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2936-2940 (1983).
- RUFF M., SCHIFFMANN E., TERRANOVA V., PERT C.B. Neuropeptides are chemoattractants for human tumor cells and monocytes: a possible mechanism for metastasis. *Clin. Immunol. and Immunopathol.* 37: 387-396 (1985a).
- RUFF M., WAHL S.M., PERT C.B. Substance P receptor-mediated chemotaxis of human monocytes. *Peptides* 6: 107-111 (1985b).
- RUSH J.S., KLEIN J., FANTI P., BHAT N.R., WAECHTER C.J. Direct assay of membrane-associated protein kinase C activity in B lymphocytes in the presence of Brij 58. *Analytic Biochem.* 207: 304-310 (1992).
- RUSSELL D., KIBLER R., MATRISIAN L., LARSON D.- Prolactin receptor on human T and B lymphocytes. *J.Immunol.* 134:3027 (1985).
- SACERDOTE P., BIANCHI M., PENARAI A.E. Human monocyte chemotactic activity of calcitonin and somatostatin-related peptides: modulation by chronic peptide

- treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70: 141-146 (1990).
- SANCHEZ-MADRID F., NAGAY J.A., ROBBINS E., SIMON P., SPRINGER T.A.- A human leukocyte differentiation antigen family with distinct subunits and common beta subunit: the lymphocyte function associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor OKM-1, Mac-1 and the p150,95 molecule. *J. Exp. Med.* 158:170 (1989).
- SAUSVILLE E.A., LEBACQ-VERHEYDEN A.M., SPINDEL E.R., CUTTITA F., GAZDAR A.F. BATTEY J.F. Expression of the gastrin-releasing peptide gene in human small cell lung cancer. Evidence for alternative processing resulting in three distinct mRNAs. *J. Biol. Chem.* 261: 2451-2457 (1986).
- SCARBOROUGH D.E., LEE S.L., DINARELLO C.A., REICHLIN S. Interleukin-1 beta stimulates somatostatin biosynthesis in primary cultures of fetal rat brain. *Endocrinology* 124(1): 549-551 (1989).
- SCHIFFMANN E., GALLIN J.I. Biochemistry of phagocyte chemotaxis. *Curr Top. Cell. Regul.* 15: 203-261 (1979).
- SCHIFFMANN E. Leukocyte chemotaxis. *Annual. Rev. Physiology.* 44: 553-568 (1982).
- SCHIMPF R.M., REPELLIN A.M. Production of interleukin 1 α and interleukin 2 by mononuclear cells in healthy adults in relation to different experimental conditions and to the presence of growth hormone. *Horm. Res.* 33(5): 171-176 (1990).
- SCICCHITANO R., DAZIN P., BIENNENSTOCK J., PAYAN D.G., STANISZ A.M. Distribution of somatostatin receptors on murine spleen and Peyer's patch T and B lymphocytes. *Brain, Behavior and Immunity* 1:173-184 (1987).
- SCOTT CH. F., CASHMAN N., SPITLER L.E. Experimental allergic encephallitis; treatment with drugs. *J. Immunopharmacol.* 4(3): 153-162 (1983).
- SEGURA J.J., GUERRERO J.M., GOBERNA R., CALVO J.R. Characterization of functional receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) in rat peritoneal macrophages. *Regul. Peptides* 33:133-143 (1991).
- SEGURA J.J., GUERRERO J.M., GOBERNA R., CALVO J.R. Stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on cyclic AMP production in rat peritoneal

- macrophages. *Reg Peptides* 37:195-203 (1992).
- SELYE H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Brain J. Exp. Pathol.* 17: 234-238 (1936).
- SERRA M.C., BAZZONI F., DELLA BIANCA V., GRESKOWIAK M., ROSSI F. Activation of human neutrophils by substance P. *J. Immunol.* 141: 2118-2124 (1988).
- SERRANO R., ALONSO C., SOLANA R., MONTSERRAT J., MUÑOZ J., PEÑA J. Identification of a tumor factor inducing resistance to NK cell lysis. *Immunol. Lett.* 20: 311-316 (1989).
- SERRANO R., YIANGOU Y., SOLANA R., SACHS J.A., PEÑA J. Isolation of a novel tumor protein that induces resistance to natural killer cell lysis. *J. Immunol.* 145: 3516-3523 (1990).
- SHELLY J., HOFF S.F. Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs on isolated human polymorphonuclear leukocytes. *Gen. Pharmacol.* 20: 329-334 (1989).
- SHOWELL H.J., FREER R.J., ZIGMOND S.H., SCHIFFMANN E., ASWANIKUMAR S., CORCORAN B., BECKER E.L.- The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal enzyme secretion for neutrophils. *J. Exp. Med.* 143:1154-69 (1976).
- SILVERSTEIN S.C., GREENBERG S., DI VIRGILIO F., STEINBERG T.H.- Phagocytosis. *Fundamental Immunology* (2^o ed). W.E. Paul(ed). Raven Press. NY. Cap. 25 pp. 703-720 (1989).
- SINNETT-SMITH J., LEHMANN W., ROZENGURT E. Bombesin receptor in membranes from Swiss 3T3 cells. *Biochem. J.* 265: 485-493 (1990).
- SIRIANNI M.C., ANNIBALE B., TAGLIAFERRI F., FAIS S., DE LUCA S., PALLONE F., DELLE FAVE G., AIUTI F. Modulation of human natural killer activity by vasoactive intestinal peptide (VIP) family. VIP, glucagon and GHRF specifically inhibit NK activity. *Reg. Peptides* 38: 79-87 (1992).
- SISSONS J.C., OLDSTONE M.B.A. Antibody-mediated destruction of virus infected cells. *Adv. Immunology* 29:209-213 (1980).
- SI-XUN Y., XIAO-YU L. Enhancement of Interleukin-1 production in mouse peritoneal

- macrophages by methionine-enkephalin. *Acta Pharmacol. Sinica* 10 (30): 266-270 (1989).
- SHAW C., THIM L., CONLON J.M. Primary structure and tissue distribution of guinea pig gastrin-releasing peptide. *J. Neurochem.* 49: 1348-1350 (1987).
- SHIFFMANN E., GALLIN J.I. Biochemistry of phagocytes chemotaxis. *Curr. Top. Cell Regul.* 15: 203-216 (1979).
- SHUBERT T., MULLER W.E. N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induced accumulation of inositol phosphates indicates the presence of oligopeptide chemoattractant receptors on circulating lymphocytes. *FEBS Letters* 257: 174-176 (1989).
- SHUMANN M.A., GARDNER P. Modulation of membrane K⁺ conductance in T-lymphocytes by substance P via a GTP-binding protein. *J. Membrane Biol.* 111: 133-139 (1989).
- SILVERSTEIN S.C., GREENBERG S., DI VIRGILIO F., STEINBERG T. Phagocytosis. In *Fundamental Immunology*. Ed. Paul W.E. Raven Press. N.Y. (1989).
- SMITH E.M., PHAN M., COPPENHAVER D., KRUGER T.E., BLALOCK J.E. Human lymphocyte production of immunoreactive thyrotrophin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6010 (1983).
- SMITH E.M., BROSNAN P., MEYER W.J., BLALOCK J.E. An ACTH receptor on human mononuclear leukocytes. *New England J. Med.* 317: 1266-1269 (1987).
- SNYDERMAN R., PIKE M.C. Chemoattractant receptors on phagocytic cells. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 257-281 (1984).
- SODER O., HELLSTROM P. Neuropeptide regulation of human thymocyte, guinea pig T lymphocyte and rat B lymphocyte mitogenesis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 84,205. (1987).
- SPADONI G.L., SPAGNOLI A., CIANFARANY S., DEL-PRINCIPE D., MENICHELLI A., DI-GIULIO S., BOSCHERINI B. Enhancement by growth hormone of phorbol diester-stimulated respiratory burst in human polymorphonuclear leukocytes. *Acta Endocrinol. Copenh.* 124(5): 589-594 (1991).

- SPANGELO B.L., JUDD A.M., ISAKSON P.C., McLEOD R.M. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* 125(1): 575-577 (1989).
- SPINDEL E.R., CHIN W.W., PRICE J., REES L.H. BESSER G.M. HABENER J.F. Cloning and characterization of cDNAs encoding human gastrin-releasing peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5699-5703 (1984).
- SPINDEL E.R. Mammalian bombesin-like peptides. *Trends in Neurosci.* 9:130-133 (1986).
- SPINDEL E. R., KRANE I.M. Molecular biology of bombesin-like peptides comparison of cDNAs encoding human gastrin-releasing peptide, human neuromedin B and amphibian ranatensin. *Annals N. Y. Acad. Sci.* 547:10-20 (1988).
- SPORN M.B., ROBERTS A.B. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature* 332: 217-219 (1988).
- SPRINGER T.A., ANDERSON D.C.- The importance of the Mac-1, LFA-1, glycoprotein family in monocyte and granulocyte adherence, chemotaxis and migration into inflammatory sites: Insights from an experiment of nature. *Clba Found. Symposium* 118:102-120 Pitman. London (1986).
- SPRINGER T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-433 (1990).
- STALEY J., COY D.H., JENSEN R.T., MOODY T.W. Solubilization and purification of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors from human cell lines. *J. Mol. Neurosci.* 4:29-39 (1993).
- STANISZ A.M., BEFUS A.D., BIENENSTOCK J. Differential effects of VIP, substance P and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferation by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and spleen. *J.Immunol.* 136:152 (1986)
- STANISZ A.M., SCICITANO R., DAZIN P., BIENENSTOCK J., PAYAN D.G. Distribution of substance P receptors on murine spleen and Peyer's patches T and B cells. *J.Immunol.* 139:749-754 (1987).
- STAUTON D.E., DUSTIN M.L., SPRINGER T.A.- Functional cloning of ICAM-2 a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339: 61-64 (1989).

- STEAD R.H., BIENNENSTOCK J., STANISZ H.M.- Neuropeptide regulation of mucosal immunity. *Immunol.Rev.* 100:333-359 (1987).
- STERNBERG E.M., TRIAL J., PARKER C.W. Effect of serotonin on murine macrophages: suppression of Ia expression by serotonin and its reversal by 5-HT₂ serotonergic receptor antagonist. *J. Immunol.* 137: 276-282 (1986).
- STROM T.B., SYTKOWSKY A.J., CARPENTER C., MERRIL J.P. Cholinergic augmentation of lymphocyte-mediated cytotoxicity. A study of the cholinergic receptor of cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 71: 1330-1333(1974).
- STROM T.B., LANE M.A., GEORGE K. The parallel time dependent bimodal change in lymphocyte cholinergic binding activity and cholinergic influence upon lymphocyte-mediated cytotoxicity after lymphocyte activation. *J. Immunol.* 127: 705-710 (1981).
- SWOPE S.L., SCHONBRUNN A. Characterization of ligand binding and processing by bombesin receptors in an insulin-secreting cell line. *Biochem. J.* 247: 731-738 (1987).
- SWOPE S.L., SCHONBRUNN A. The biphasic stimulation of insulin secretion by bombesin involves both cytosolic free calcium and protein kinase C. *Biochem. J.* 253: 193-202 (1988).
- SZEKERES-BARTHO J., CSERNUS V., HADNAGY J., PACSA A.S. The immunosuppressive effect of progesterone during pregnancy depends on the progesterone binding capacity of the lymphocytes. *J. Reprod. Immunol.* 5: 81-89 (1983).
- SZEPESHAZI K., SCHALLY A.V., HALMOS G., GROOT K., RADULOVIC S. Growth inhibition of estrogen-dependent and estrogen-independent MXT mammary cancers in mice by the bombesin and gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095. *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 1915-1922 (1992).
- TACHE Y., PITTMAN Q., BROWN M. Bombesin-induced poikilothermia in rats. *Brain Res.* 188:525-530 (1980).
- TRINCHIERI G. Biology of NK cells. *Adv. Immunology* 47:187-376 (1989).
- TRIPP C.S., WOLF S.F., UNANUE E.R. Interleukin-12 and tumor necrosis factors are

- ostimulators of interferon a production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with histereiosis and interleukin 10 is a physiological antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3725-3279 (1993).
- TSOUKAS C.D., PROVEDINI D.M., MANALAGAS S.C. 1,25-dihydroxyvitamin D₃: a novel immunoregulatory hormone. *Science* 224: 1438-1440 (1984).
- UEHARA A., GILLIS S., ARIMURA A. Effect of interleukin-1 on hormone release from normal rat pituitary cells in primary culture. *Neuroendocrinology* 45: 343-347 (1987).
- UMEDA Y., TAKAMIYA M., IOSHIZAKI H., ARISAWA M. Inhibition of mitogen-stimulated T lymphocyte proliferation by calcitonin gene-related peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 227-231 (1988).
- UNANUE E.R., ALLEN P.M.- The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236:551-557 (1987).
- VAN EPPS D., SALAND L. beta - endorfin and met-enkephalin stimulate human peripheral blood mononuclear cells chemotaxis *J. Immunology* 132, 3046-3053 (1984).
- VAN TOL E.A.F., ELZO KRAEMER C.V., VERSPAGET H.W., MASCLÉE A.M., LAMERS C.B.H.W. Intravenous administration of bombesin in man stimulates natural killer cell activity against tumor cells. *Neuropeptides* 18: 15-21 (1991).
- VAN TOL E.A.F., VERSPAGET H.W., LAMERS C.B.H.W. Neuropeptide regulation of cell-mediated cytotoxicity against human tumor cells. *Neuropeptides* 16: 25-32 (1990).
- VAN WAUME J.P., DE MEY J.R., GOOSENS J.G. OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J. Immunol.* 124: 2708-2713 (1980).
- VIDOLLER A., LARREN F., MENDEZ J., ALCOCER-VARELA J., ALARCON-SEGOVIA D.- T-cell dysregulation in patients with hyperprolactinemia. Effect of bromocriptine treatment. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 38:337 -343 (1986).
- VON SCHRENCK T., WANG L-H., COY M.L. VILLANUEVA S. MANTEY J.D., JENSEN R.T. Characterization of a neuromedin B-preferring receptor in esophageal muscle:

- evidence for subtypes of bombesin receptors. *Am J. Physiol.* 256: G747 (1989).
- VUIST W.M.J., VISSEREN M.J.W., OTSEN M., BOS K., VYTH-DREESE F.A., FIGDOR C.G., MELIEF C.J.M. HEKMAN A. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of human peripheral blood lymphocytes with interleukin-2 and interferon α . *Cancer Immunol. Immunother.* 36: 163-170 (1993).
- WAGNER F., FINK R., HART R., DANAYGIER H. Substance P enhances interferon- γ production by human peripheral mononuclear cells. *Reg Peptides* 19: 355 (1987).
- WALTON P.E., CRONIN M.J. Tumor necrosis factor-alpha inhibits growth hormone secretion from cultured anterior pituitary cells. *Endocrinology* 125(2): 925-929 (1989).
- WATSON S.R., FENNIE C., LASKY L.A. Neutrophil influx into inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimera. *Nature* 349: 164-167 (1991).
- WEBER S., ZUCKERMAN J.E., BOSTWICK D.G., BENSCH K.G., SIKIC B.I., RAFFIN T.A. Gastrin releasing peptide is a selective mitogen for small cell lung carcinoma in vitro. *J. Clin. Invest* 75: 306-309 (1985).
- WEBSTER E.L., TRACEY D.E., JUTILA M.A., De SOUZA E.B. Corticotropin releasing factor receptors in mouse spleen: identification of receptor-bearing cells as resident macrophages. *Endocrinology* 127: 440-445 (1990).
- WEIGENT D.A., BLALOCK J.E. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. *Immunol. Rev.* 100:79-108 (1987).
- WEIGENT D.A., CARR J.J., BLALOCK J.E. Bidirectional communication between the neuroendocrine and immune systems. Common hormones and hormone receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 579:17-27 (1990).
- WEINSTOCK J.V., BLUM A., WALDER J., WALDER R. Eosinophils from granulomas in murine Schistosomiasis mansoni produce substance P. *J. Immunology* 141: 961 (1988).
- WEISS A. T lymphocyte activation. In *Fundamental Immunology*. Ed. Paul W.E. Raven Press. N.Y. (1989).
- WESTENDORF J.M., SCHONBRUNN A. Characterization of bombesin receptors in a

- rat pituitary cell line. *J. Biol. Chem.* 258: 7525-7535 (1983).
- WESTENDORF J.M., SCHONBRUNN A. Bombesin stimulates prolactin and growth hormone release by pituitary cells in culture. *Endocrinology* 110:352-358 (1982).
- WIEDERMANN C.J., ADAMSON I.Y.R., PERT C.B., BOWDEN D.H. Enhanced secretion of immunoreactive bombesin by alveolar macrophages exposed to silica. *J. Leukocyto Biol.* 43: 99-103 (1988).
- WIEDERMANN C.J., NIEDERMUHLBICHLER M., ZILIAN U., GEISLER D., LINDLEY I., BRAUNSTEINER H. Primung of normal neutrophils by tachykinins: tuftsin-like inhibition of in vitro chemotaxis stimulated by formylpeptide or IL-8. *Reg. Peptides* 36: 359-368 (1991).
- WILLEMS J., LECLERQ G., JONIAU M. Enhanced oxygen metabolism of peritoneal macrophages in the presence of murine neuroblastoma cells is partly caused by enkephalins. *J. Neuroimmunol* 19: 269-278 (1988).
- WILLEY J.C., LECHNER J.F., HARRIS C.C. Bombesin and C-terminal tetradecapeptide of gastrin-releasing peptide are growth factors for normal human bronchial epithelial cells. *Exp. Cell. Res.* 153: 245-248 (1984).
- WILSON I.D., SOLITIS R.D., OLSON R.E., ERLANDSEN S.L. Cholinergic stimulation of immunoglobulin A secretion in rat intestine. *Gastroenterology* 83: 881-888 (1982).
- WOOD C.L., O'DORISIO M.S. Covalent cross-linking of vasoactive intestinal polypeptide to its receptors on intact human lymphoblasts. *J. Biol. Chem.* 260: 1243-47 (1985).
- WOZNIAK A., McLENNAN G., BETTS W.H., MURPHY G.A., SCICCHITANO R. Activation of human neutrophils by substance P: effect on FMLP-stimulated oxidative and arachidonic acid metabolism and on antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity. *Immunology* 68:359-364 (1989).
- YIANGOU Y., SERRANO R., BLOOM S.R., PAÑA J., FESTENSTEIN H. Effects of propro-vasoactive intestinal peptide-derived peptides on the immune response. *J. Neuroimmunol.* 29: 65-72 (1990).
- YU S.S., LEFKOWITZ R.J., HAUSDORFF W.P. β -adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* 268: 337-341

(1993).

ZABRENETZKY V., GALLIN E.K. Inositol 1,4,5-trisphosphate concentrations increase after adherence in the macrophage-like cell line J774.1. *Biochem. J.* 255: 1037-1043 (1988).

ZACHARY I., ROZENGURT E. High-affinity receptors for peptides of the bombesin family in Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 82: 7616-7620 (1985).

ZACHARY I., SINNETT-SMITH J.W., ROZENGURT E. Early events elicited by bombesin and structurally related peptides in quiescent Swiss 3T3 cells. I. Activation of protein kinase C and inhibition of epidermal growth factor binding. *J. Cell. Biol.* 102:2211-2222 (1986).

ZACHARY I., ROZENGURT E. Identification of a receptor for peptides of the bombesin family in Swiss 3T3 cells by affinity cross-linking. *J. Biol. Chem.* 262: 3947-3950 (1987).

ZIMMERMAN G.A., McINTYRE T.M.- Neutrophil adherence to human endothelium 'in vitro' occurs by CDw18 (Mo1, Mac-1 / LFA-1 / GP 150,95) glycoprotein dependent and glycoprotein independent mechanisms. *J.Clin.Invest.* 81:531-37 (1988).

ZIMMERMAN G.A., PRESCOTT S.M., McINTYRE T.M. Endothelial cell interactions with granulocytes: Tethering and signalling molecules. *Immunology Today* 13: 93-100 (1992).

ZWILING B.S., LAFUSE W.P., BROWN D., PEARL D. Characterization of ACTH mediated suppression of MHC class II expressed by murine peritoneal macrophages. *J. Neuroimmunol.* 39:133-138 (1992).