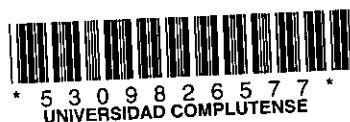


21882

**MODULACION NEUROPEPTIDICA EN LA PRODUCCION DE MEDIADORES
INFLAMATORIOS POR LEUCOCITOS CIRCULANTES DE SANGRE
PERIFERICA: VARIACIONES CON LA EDAD Y ESTADO PATOLOGICO**



Rita Encarnación Tato Rocha

1997

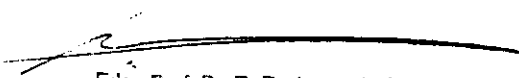
21.882

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS


El trabajo que presenta bajo mi dirección la doctoranda D^a Rita Encarnación TATO ROCHA, titulado : "Modulación neuropéptica de la producción de mediadores inflamatorios por leucocitos circulantes de sangre periférica: variaciones con la edad y estado patológico" reúne los requisitos de originalidad, rigor metodológico e interés científico que precisa reunir una Memoria de Tesis Doctoral. Particularmente merece destacarse que se trata del primer estudio realizado hasta la fecha en seres humanos que confirma la interrelación existente entre los sistemas nervioso e inmune, a la vez que demuestra una ruptura de esta modulación durante el envejecimiento y en los pacientes seniles con diabetes mellitus no-insulin-dependiente.

Vº Bº
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis


Fdo.: Prof. Dr. R. Enriquez de Salamanca
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA
Fdo.: _____
(Fecha y firma)

DNI 1464335


Fdo.: Francisco Arnalich Fernández
(Fecha y firma) 7 Mayo 1997

DNI 26.173.288

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

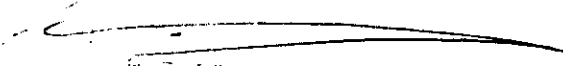
Prof. D. Rafael Enríquez de Salamanca, Director del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la UCM

INFORMO: que una vez examinado el Trabajo presentado por Dña. RITA ENCARNACIÓN TATO ROCHA titulado: "MODULACIÓN NEUROPEPTIDICA DE LA PRODUCCIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS POR LEUCOCITOS CIRCULANTES DE SANGRE PERIFERICA: INFLUENCIA DE LA EDAD Y ESTADO PATOLOGICO", dirigido por D. Francisco Arnalich Fernandez y tutelada por D. Rafael Enríquez de Salamanca, este Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

El Director del Departamento

8 MAYO 1997


Fdo.: Prof. Dr. R. Enriquez de Salamanca
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA

(Fecha y firma) 8 MAYO 1997

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Francisco Arnalich Fernández, Profesor titular del Departamento de Medicina de la U.A.M. y Jefe de Sección de Medicina Interna del Hospital "La Paz", y Angel Hernanz Macías, Adjunto del Servicio de Bioquímica del Hospital "La Paz", directores de esta tesis, por su confianza y ayuda, sin los que no hubiera sido posible la realización de este estudio.

Al Doctor Carlos Perezagua Clamagirand, Catedrático de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por su amabilidad al aceptar la tutoría de esta tesis.

A las enfermeras Manuela Tejada y María Luisa Nieto del Laboratorio de Neuroquímica del Servicio de Bioquímica del Hospital "La Paz" por su paciencia y ayuda.

A todos los miembros del Servicio de Bioquímica del Hospital "La Paz" por su colaboración.

INDICE

1. INTRODUCCION	8
1.1. Interacciones entre sistema nervioso y sistema inmune	9
1.2. Neuropéptidos y sus receptores en el sistema inmune. Efectos inmunomoduladores	16
1.2.1. Neuropéptido Y	18
1.2.2. Somatostatina	22
1.2.3. Péptido intestinal vasoactivo	25
1.2.4. Péptido liberador de gastrina	29
1.3. Citoquinas y sus receptores en el sistema nervioso	33
1.3.1. Interleuquina 1	37
1.3.2. Interleuquina 6	39
1.3.3. Factor de necrosis tumoral	40
1.4. Otros mediadores de la respuesta inmune	44
1.4.1. Leucotrieno B4	44
1.4.2. Neopterina	47
2. OBJETIVOS	54
3. MATERIAL Y METODOS	56
3.1. Pacientes	57
3.1.1. Población de estudio	57
3.1.2. Muestra de estudio	58
3.2. Métodos	59
3.2.1. Manipulación de las muestras de sangre	59
3.2.2. Protocolo de incubación	60
3.2.3. Determinación de citoquinas	61

3.2.4. Determinación de leucotrieno B4	63
3.2.5. Determinación de neopterinina	64
3.2.6. Análisis estadístico	65
4. RESULTADOS	67
4.1. Características generales de la población	68
4.2. Niveles basales de citoquinas y tras un período de incubación de 30 minutos	70
4.3. Respuesta de las citoquinas al estímulo con LPS	72
4.4. Producción de citoquinas tras el estímulo con neuropéptidos	74
4.4.1. Respuesta al neuropéptido .Y	74
4.4.2. Respuesta a la somatostatina	75
4.4.3. Respuesta al péptido intestinal vasoactivo	76
4.4.4. Respuesta al péptido liberador de gastrina	78
4.5. Producción de citoquinas en respuesta al estímulo combinado de neuropéptidos y lipopolisacárido	81
4.5.1. Respuesta al NPY combinado con LPS	81
4.5.2. Respuesta a la somatostatina combinada con LPS	83
4.5.3. Respuesta al VIP combinado con LPS	84
4.5.4. Respuesta al GRP combinado con LPS	86
4.6. Producción de leucotrieno B4	89
4.6.1. Niveles basales y tras un período de incubación de 30 minutos	89
4.6.2. Respuesta al estímulo con LPS	89
4.6.3. Respuesta al estímulo con neuropéptidos	90
4.7. Producción de neopterinina	92
4.7.1. Niveles basales y tras un período de incubación de 30 minutos	92

4.7.2. Respuesta al estímulo con LPS	92
4.7.3. Respuesta al estímulo con neuropéptidos	93
5. DISCUSION	136
5.1. Papel modulador de los neuropéptidos en la producción de citoquinas	141
5.2. Papel modulador de los neuropéptidos en la producción de leucotrieno B4 y neopterinina	149
5.3. Variaciones según la edad de la producción de citoquinas tras la estimulación con diversos neuropéptidos	153
5.4. Modulación neuropeptídica de la producción de citoquinas en ancianos diabéticos no insulíndependientes. Diferencias con ancianos sanos	157
6. CONCLUSIONES	160
7. RESUMEN	163
8. BIBLIOGRAFIA	166
9. PIES FIGURAS Y TABLAS	205
10. GLOSARIO ABREVIATURAS	210

INTRODUCCION

1.1. INTERACCIONES ENTRE EL SISTEMA NERVIOSO Y EL SISTEMA INMUNE

El control de la respuesta inmune tradicionalmente se atribuía a interacciones entre células inmunocompetentes que secretaban diversas sustancias reguladoras y que, a su vez, reconocían señales procedentes de otras células del sistema inmune (Bellanti, 1994). Sin embargo, numerosos hallazgos han confirmado que el sistema nervioso, previamente considerado no inmunocompetente, podría interactuar y modular al sistema inmune, es decir habría un lenguaje bioquímico común entre ambos sistemas (Payan et al., 1984b; Morley, 1987).

Esta comunicación estaría mediada por hormonas, neurotransmisores y citoquinas que, bien directamente o a través de receptores situados en las células inmunocompetentes, establecerían una comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el sistema nervioso (Figura 1).

Los primeros descubrimientos tienen su origen en los clásicos experimentos de condicionamiento realizados por Pavlov (Pavlov, 1928). En 1926, Metal'nikov y Chorine observaron que, al igual que muchas otras respuestas fisiológicas, la respuesta inmune podría estar condicionada. La conclusión de sus estudios fue que el sistema nervioso central podría estar implicado en la respuesta inmune. Más recientemente, Ader et al. (1990) confirmaron estos hallazgos mostrando que cuando la sacarina se utilizaba como un estímulo condicionado podía reducir la respuesta humoral después de ser administrada conjuntamente con ciclofosfamida.

Con la integración de la neurociencia y la endocrinología y el desarrollo del concepto de estrés, surgió una posible explicación a cerca de cómo el sistema inmune podría estar regulado por el sistema nervioso central. Esta explicación, en parte, se basa en los experimentos de involución tímica originados durante procesos de estrés en los que se liberan glucocorticoides ejerciendo un efecto inmunosupresor (Selye, 1936).

Actualmente, se sabe que no solamente están implicados glucocorticoides sino que intervienen diversas hormonas y, más específicamente, algunos neuropéptidos que poseen receptores en células inmunorreguladoras, modulando así la función del sistema inmune.

Otro aspecto peor conocido, pero quizás el más reciente avance en el campo de la neuroinmunoendocrinología, es el reconocimiento de que el sistema inmune puede regular las funciones nerviosas. Este hecho proporciona las bases bioquímicas para comprender que la comunicación, entre el sistema inmune y el sistema nervioso, es bidireccional y no unidireccional.

Existen evidencias de la acción inmunorreguladora ejercida, in vivo, por el sistema nervioso. Se han encontrado alteraciones en el número y función de los linfocitos y producción de anticuerpos en animales con lesiones electrolíticas en áreas concretas del cerebelo (Brooks et al., 1982). Además, la estimulación de nervios simpáticos postganglionares que inervan la médula ósea se ha visto que aumenta la producción de linfocitos (Webber, 1970). Roszman et al. (1985) comprobaron que las lesiones en el hipocampo, amígdalas y cuerpos mamilares producían la activación de

esplenocitos y timocitos en respuesta al mitógeno Con A. Estos autores encontraron que tras la extirpación de la hipófisis se perdían estos efectos, deduciendo que las alteraciones inmunológicas podrían ser debidas a lesiones en el sistema nervioso central. Por otra parte, observaron que lesiones producidas en la porción anterior del hipotálamo tenían efectos inmunosupresores, y esta inmunosupresión no solamente era debida a un aumento de los niveles de glucocorticoides, sino más bien a un aumento en la actividad supresora de los macrófagos.

Un ejemplo más concreto del efecto inmunomodulador ejercido por el sistema nervioso, es el papel de la sustancia P en la artritis reumatoide (Hernanz et al. 1993). Las articulaciones distales que presentan un mayor riesgo de desarrollar un proceso severo, están más densamente inervadas por neuronas sensitivas aferentes y presentan un umbral nociceptivo significativamente más bajo que las articulaciones de bajo riesgo. La concentración de sustancia P es claramente superior en las articulaciones de alto riesgo antes del comienzo de la artritis. Así pues, la diferencia en la concentración de sustancia P entre ambos tipos de articulaciones, viene marcada por el contenido intraneuronal de sustancia P (Levine et al., 1984; Levine et al., 1985).

Por otra parte, se ha visto también que las células del sistema inmune secretan sustancias que afectan al sistema nervioso, o bien son constituyentes del mismo (Blalock, 1994).

El sistema nervioso puede regular al sistema inmune a través de dos vías principales:

a) La secreción neuroendocrina de hormonas, neurotransmisores y citoquinas que se distribuyen por el sistema circulatorio hasta los órganos inmunes.

b) Inervación de órganos linfoides.

Esta comunicación es facilitada por el sistema nervioso autónomo a través de la inervación de los órganos linfoides primarios y secundarios. Las fibras del sistema noradrenérgico se distribuyen hasta el interior del timo, médula ósea, bazo, ganglios axilares y tejido linfoide asociado al tracto digestivo (Felten et al., 1985; Bellinger et al., 1989).

Las células del sistema inmune, sobre todo linfocitos y macrófagos, poseen zonas específicas y con alta afinidad para unirse a la mayor parte de los péptidos neuroendocrinos. Ello, junto con la función inmune ejercida por muchas hormonas peptídicas y neurotransmisores sugiere que las células inmunocompetentes producen y liberan péptidos que se acoplan a receptores específicos de esas moléculas sobre su superficie celular (Blalock, 1994).

Por otra parte, las células inmunes gracias a un elaborado sistema de recirculación, pueden distribuirse por todo el organismo a través del sistema circulatorio a los tejidos y de éstos al sistema linfático cerrando el circuito. De esta forma, tienen la oportunidad de entrar en contacto con posibles partículas invasoras y al mismo tiempo con neuropéptidos y neurotransmisores (Picker, 1992; Bellanti, 1994). En el contexto de esta comunicación bidireccional de información entre el sistema nervioso y el sistema inmune, surge la idea de que el sistema inmune pueda actuar

como un órgano sensorial, pudiendo percibir estímulos no reconocidos por los sistemas nerviosos central y periférico.

Se conoce bien que órganos y tejidos del sistema inmune poseen terminaciones nerviosas, constituyendo así un ambiente adecuado para una directa regulación nerviosa del sistema inmune. Esta regulación se basa en que la inducción de ciertas lesiones neurales tienen como consecuencia graves efectos en el número y función de células de la médula ósea y células linfoides del timo y bazo (Blalock, 1984). Por otra parte, la estimulación de nervios periféricos o del cerebro puede originar cambios en la respuesta inmune.

Estos estímulos, denominados "no cognitivos" incluyen bacterias, tumores, virus, etc..., y su reconocimiento por células inmunocompetentes es convertida en información en forma de hormonas y citoquinas que pueden modular la función neuroendocrina. Por otra parte, el reconocimiento de estímulos "cognitivos" por el sistema nervioso da lugar a una información que es transmitida mediante neurotransmisores a receptores específicos en células inmunocompetentes, originando una serie de cambios en la respuesta inmune (Blalock, 1984).

Por ello se cree que la función sensorial del sistema inmune se parecería al sistema neuroendocrino, en el sentido de que un determinado estímulo originaría un cambio hormonal y consecuentemente una respuesta fisiológica. Si esto es así, la fisiopatología asociada a un agente antigénico infeccioso o tumoral podría estar de alguna forma relacionada con una o más hormonas, neuropéptidos o citoquinas, producidos por células del

sistema inmune.

La capacidad de sustancias inmunes para actuar a nivel del sistema neuroendocrino fue sugerido ante la observación de que los niveles hormonales en animales se alteran en respuesta a cambios antigénicos. Además, ante determinados estímulos, péptidos neurotransmisores y sus receptores pueden ser sintetizados por las propias células inmunocompetentes, donde actuarían como reguladores endógenos del crecimiento y de la función inmune. Parece obvio pensar que estos péptidos así producidos podrían ejercer una función paracrina en otras células, como por ejemplo las neuronas.

De igual forma que el sistema inmune produce péptidos neuroendocrinos, es muy probable que el sistema nervioso en ciertas circunstancias pueda producir citoquinas que actuarían como transmisores de la respuesta inmune.

Así, la mayoría de las células nerviosas no sólo poseen receptores específicos que responden a diversas citoquinas, sino que también pueden producirlas. Tales circunstancias sugieren una acción autocrina o paracrina de las citoquinas; por ejemplo, la interleuquina-2 (IL-2) es a la vez un regulador negativo autocrino/paracrino de la proliferación de las células hipofisarias normales y un estimulador de la proliferación de las células del adenoma hipofisario productor de GH. Por otra parte, una acción paracrina de la IL-1 se observa a nivel hipotálamo-hipofisario, ya que parece inducir la síntesis de IL-6 por células hipofisarias (Blalock, 1984).

La capacidad de los péptidos neuroendocrinos para funcionar como

citoquinas y de éstas para originar una respuesta hormonal aumentando la posibilidad de que los sistemas nervioso, endocrino e inmune puedan recibir y enviar señales mediadas por ciertos transmisores (por ejemplo citoquinas) o neurotransmisores (por ejemplo sustancia P, péptido liberador de gastrina o péptido intestinal vasoactivo). La existencia de esta comunicación bidireccional sólo es posible gracias a que los sistemas inmune y nervioso comparten neurotransmisores, hormonas, citoquinas y receptores constituyendo un completo circuito de información entre ambos sistemas (Blalock, 1984; Blalock, 1989; Blalock, 1994).

1.2. NEUROPEPTIDOS Y SUS RECEPTORES EN EL SISTEMA INMUNE. EFECTOS INMUNOMODULADORES.

El control que sobre el sistema inmune ejerce el sistema nervioso 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 inervación noradrenérgica y peptidérgica de los tejidos linfoides sugiere una realidad física en la que basar esta regulación. La posibilidad, por ejemplo, de que nervios periféricos podrían modular la respuesta inmune local fue observada tras el hallazgo de los neuropéptidos sustancia P y somatostatina en las terminaciones nerviosas distales de tejidos que habían sufrido algún tipo de lesión o inflamación (Payan, 1984a; Stead et al., 1987).

Para que la acción de los mediadores producidos por el sistema nervioso tenga lugar sobre el sistema inmune in vivo, es necesario que estas sustancias estén presentes localmente en concentraciones suficientes para provocar una respuesta. Por eso es tan importante la relación microanatómica de los nervios periféricos con las células inmunocompetentes. Así, se ha encontrado inervación en órganos linfáticos tanto primarios como secundarios, estando inervadas predominantemente las zonas T dependientes de estos órganos (Felten et al., 1985).

La modulación de la respuesta inmune por el sistema nervioso es una regulación local, ya que los neuropéptidos son producidos en cantidades relativamente pequeñas y tienen una vida media corta debido a su mayor sensibilidad a enzimas hidrolíticas (Hökfelt, 1991). De esta forma, el control

ejercido por los neuropéptidos parece ser de tipo paracrino ya que llegan a esas células gracias a la inervación de órganos inmunes, aunque la síntesis de neuromoduladores por células inmunocompetentes tampoco se descarta (Homo-Delarche y Dardenne, 1993; Blalock, 1994).

De los neuropéptidos conocidos, algunos de ellos han sido investigados en cuanto a su posible acción sobre la función inmune. Estos mediadores modifican la actividad y metabolismo de las células inmunocompetentes a diversos niveles.

Así se sabe que la sustancia P y la somatostatina pueden modular reacciones de inmunidad celular (Payan y Goetzl, 1985). A una concentración de nivel nanomolar, la sustancia P estimula los procesos de fagocitosis en macrófagos de ratón o en leucocitos polimorfonucleares humanos. Stefano et al. (1992) atribuyen este hecho, así como de que monocitos puedan producir monoquinas a la activación de la endopeptidasa neutral por ciertos inmunocitos. Esta capacidad estimuladora reside en el tetrapéptido NH₂-terminal, mientras que la porción COOH-terminal sería la responsable de la estimulación de los procesos de quimiotaxis in vitro en leucocitos polimorfonucleares (Numao y Agrawal, 1992). Por otra parte, la sustancia P y la somatostatina pueden tener efectos opuestos, ya que la sustancia P incrementa la recaptación por los linfocitos T de [³H]timidina y leucina en presencia o ausencia de mitógenos, mientras que la somatostatina la disminuye.

Otros neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), quizás el péptido inmunorregulador neuroendocrino mejor estudiado, es capaz de

inhibir la respuesta proliferativa inducida por mitógenos de los linfocitos T (Ottaway y Greenberg, 1984), modular la migración linfocitaria (Ottaway, 1984) y regular la expresión de IL-2 en linfocitos T estimulados de ratón (Ganea y Sun, 1993). La neurokinina A (NKA) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) también pueden modular la función de quimiotaxis en eosinófilos humanos (Numao y Agrawal, 1992) y además, la NKA puede estimular la liberación de citoquinas por monocitos humanos (Lotz et al, 1988).

Globalmente, todas estas observaciones sugieren que dichos neuropéptidos pueden contribuir a la respuesta inmune-inflamatoria, no solamente como neurotransmisores sino también como neuromoduladores.

En este apartado de nuestra Memoria de Tesis Doctoral describiremos lo que se conoce del neuropéptido Y (NPY), somatostatina, péptido liberador de gastrina (GRP) y péptido intestinal vasoactivo (VIP) acerca de su acción sobre el sistema inmune.

1.2.1. NEUROPEPTIDO Y

El neuropéptido Y (NPY), originariamente aislado por Tatemoto et al. en 1982, pertenece a una familia de péptidos de 36 aminoácidos en la que también se incluyen el péptido YY y el polipéptido pancreático. Presentan una secuencia de aminoácidos similar y una estructura carboxiamidoterminal. Presentan residuos clave que adoptan el llamado repliegue PP, que se caracteriza por una hélice de prolina extendida con tres prolinas y una hélice alfa con dos tirosinas ligadas a las tres prolinas

(Fuhlendorff et al., 1990). El NPY tiene la tirosina como residuo N-terminal y la tirosinamida como residuo C-terminal (Larhammar et al., 1993).

Los genes que codifican el polipéptido pancreático, polipéptido YY y NPY se encuentran en cromosomas separados; el polipéptido pancreático es codificado por un gen situado en el cromosoma 17 al igual que el polipéptido YY (Hort et al., 1995) y el NPY por el cromosoma 7 (Baker et al., 1995).

Se ha encontrado inmunorreactividad frente al NPY en abundancia en tejidos derivados de la cresta neural en diferentes especies, incluyendo cobaya, rata, gato, cerdo y hombre. El NPY se distribuye por todo el SNC con excepción del cerebelo realizando un papel importante en una gran variedad de funciones: presión arterial, ingesta de alimentos, comportamiento sexual y ritmos circadianos (Dumont et al., 1992).

Como ocurre en otras estructuras nerviosas, el NPY coexiste en el SNC con otros neurotransmisores; así, en el teleencéfalo e hipocampo suele coexistir con la somatostatina y en el tronco encefálico con la noradrenalina (Dawbarn et al., 1984; Heilig y Widerlöv, 1990).

Su acción más importante es ser un potente vasoconstrictor tanto por su acción propia como por su capacidad de potenciar el efecto de otros vasoconstrictores endógenos, como la noradrenalina y la angiotensina II (Edvinson et al., 1987; Walker et al., 1991).

Numerosos estudios han demostrado la presencia de valores significativos del NPY circulante en el hombre, que pueden ser detectados por técnicas de radioinmunoanálisis (Theodorsson-Norheim, 1985). Se ha

estimado que la vida media del NPY en el hombre es de aproximadamente 20 minutos, por lo que el NPY circulante probablemente provenga del liberado en las terminaciones nerviosas simpáticas. De hecho la concentración plasmática de noradrenalina, marcador muy sensible del grado de actividad nerviosa simpática y aumenta en circunstancias de estimulación del sistema nervioso simpático (Morris et al., 1986; Maisel et al., 1989; Inglada et al., 1993).

Los receptores del NPY se encuentran diseminados en el sistema nervioso central, sistema nervioso periférico y en los órganos diana, existiendo evidencias de que pertenecen a la superfamilia de receptores unidos a la proteína G. Existen diferentes receptores conocidos denominados Y1, postsináptico, e Y2, presináptico, un tercer receptor postsináptico llamado Y3, un receptor del apetito o saciedad situado en el hipotálamo (Gehlert, 1994; Larhammar, 1996a) y un receptor que ligue los tres péptidos denominado "PP-fold" (Nata et al., 1990)

Los efectos de los receptores están mediados por proteínas G acopladas a los receptores inhibiendo la acumulación de AMPc (Grundemar y Håkanson, 1994; Larhammar, 1996b). El efecto de la interacción con los receptores Y1 puede estar mediado por un doble mecanismo, la inhibición de la síntesis del AMPc y un aumento del calcio intracelular. La interacción del NPY con los receptores Y2 sólo da lugar a una disminución de los valores intracelulares de AMPc, y en ciertas células neuronales produce también una alteración de la permeabilidad de los canales sodio-potasio (Waeber, 1990; Wahlestedt et al., 1986; Wahlestedt et al., 1990; Wahlestedt

et al., 1992; Beck-Sickinger y Jung, 1995).

El neuropéptido Y, péptido YY y el polipéptido pancreático, que comparten un 70% de homología en su estructura, han sido relacionados con el sistema inmune. 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 péptido YY. La acción del NPY en los órganos inmunocompetentes citados podría ser directa o potenciando los efectos de la noradrenalina (McCloskey y Potter, 1991).

El NPY disminuye la estimulación de la proliferación de linfocitos de rata en respuesta a la fitohemaglutinina (Soder y Hellstrom, 1987) y no estimula por sí mismo la proliferación espontánea (Johansson y Sandberg, 1989). En cuanto a la actividad citotóxica se ha observado una correlación negativa entre la concentración plasmática de NPY y dicha actividad en células inmunes de enfermos con demencia tipo Alzheimer (Irwin et al., 1991). Se ha observado (Nair et al., 1993) una reducción de la citotoxicidad natural (NK) de linfocitos normales a concentraciones fisiológicas del NPY. También se 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 et al., 1993a).

Otros estudios indican la existencia de altas concentraciones de NPY en tumores neuroendocrinos (feocromocitoma y ganglioneuroblastoma) (Adrian

et al., 1983) y de inmunorreactividad-NPY, así como de mRNA-NPY en megacariocitos y plaquetas humanas y en células mononucleadas de rata (Ericsson et al., 1991). Kogner et al, en 1992 demuestran que el NPY es sintetizado por linfoblastos de pacientes que padecen leucemia de células B, sugiriendo la posibilidad de un papel del NPY en el sistema hematopoyético humano.

Sin embargo, no hemos encontrado ningún estudio en relación a la posible estimulación que podría ejercer el NPY in vitro sobre las células blancas de sangre periférica humana en cuanto a la producción de citoquinas u otros marcadores de la respuesta inmune-inflamatoria.

1.2.2. SOMATOSTATINA

La somatostatina es un tetradecapéptido inicialmente descubierto en el hipotálamo porcino por Brazaeu et al., en 1973. La primera forma molecular descrita consiste en 14 aminoácidos dispuestos cíclicamente, siendo denominada somatostatina-14. Posteriormente, se halló un precursor de alto peso molecular compuesto por 28 aminoácidos, también llamado prosomatostatina, que incluye la somatostatina-14 y su grupo aminoterminal (Andrews y Dixon, 1986).

La somatostatina ha sido identificada en muchos tejidos procedentes de mamíferos, estando ampliamente distribuída en el sistema nervioso central y en muchos otros órganos, incluyendo tracto gastrointestinal, páncreas, aparato genitourinario, corazón, ojo, tiroides, timo y piel. En el sistema nervioso central está presente no solamente en el hipotálamo, sino también

en el cortex cerebral e hipocampo, ejerciendo un papel de neurotransmisor y neuromodulador; en el sistema nervioso periférico, sólo se encuentra en las fibras C y en las fibras delta-A mielinizadas (Payan, 1984; Reichlin, 1986).

Se han identificado 2 tipos de receptores, encontrándose que en la hipófisis y en el páncreas existe predominantemente un tipo de receptor para la somatostatina, mientras que en el cerebro están presentes ambos tipos y que diferentes regiones cerebrales presentan distinta proporción de ellos.

Estos hallazgos sugieren diversas funciones fisiológicas para la somatostatina, incluyendo un papel importante en el control de la función cognitiva y el sistema motor extrapiramidal (Flint Beal et al., 1985).

La somatostatina parece ejercer cuatro funciones principales:

1) Regulador neurohumoral de la hormona de crecimiento y probablemente de la hormona tiroidea estimulante, prolactina, secretina, gastrina, glucagón e insulina.

2) Neurotransmisor peptidérgico en el sistema nervioso autónomo.

3) Hormona con acción endocrina y paracrina.

4) Efecto modulador inhibitorio sobre las células inmunocompetentes (Lucey, 1986).

En 1981 Bathena et al. identifican receptores para somatostatina en monocitos y linfocitos circulantes. Experimentos in vitro han demostrado que la somatostatina inhibe funciones importantes en los linfocitos T y B (Morley, 1987), y que los linfocitos T presentan receptores

estereoespecíficos para la somatostatina.

Posteriormente, se observaron receptores en linfocitos esplénicos y en placas de Peyer (Scicchitano et al., 1987; Stead et al., 1987), así como en células de la línea mieloide (Weigent et al., 1990). Pero no sólo existen receptores para este péptido en células inmunes sino que, posiblemente éstas los sintetizan. Así se ha comprobado su presencia tanto en polimorfonucleares y linfocitos de sangre periférica (Lygren et al., 1984; Weinstock et al., 1988), como en el timo de rata (Gomariz et al., 1990).

Pronto se descubrió su efecto inhibitor sobre la proliferación linfoide (Payan, 1984). Estudios posteriores muestran resultados contrarios. Johanson y Sandberg (1989) observaron que la somatostatina actuaba estimulando la proliferación espontánea de timocitos, además de inducir la proliferación de células esplénicas en respuesta a mitógenos. Otros estudios apuntan hacia una acción inhibitoria del neuropéptido sobre células linfoides, ya que a concentraciones de 10^{-13} M a 10^{-9} M inhibe la proliferación de los linfocitos T (Payan et al., 1984a) y estimula la liberación de histamina de los mastocitos aunque no de los basófilos (Morley et al., 1987) siendo por el contrario inactiva sobre la función quimiotáctica de los monocitos humanos (Ader et al, 1990).

Estos datos sugieren que la modulación ejercida por la somatostatina sobre el sistema inmune, parece ser inhibitoria de las reacciones inmune, pudiendo jugar un papel estabilizador de la reacción inmunológica (Sacerdote et al., 1990).

1.2.3. PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un polipéptido lineal formado por 28 aminoácidos, con una secuencia similar a la que poseen la secretina y el glucagón, y aislado por primera vez como una sustancia vasodilatadora en tejido pulmonar.

Está ampliamente distribuido, encontrándose principalmente en el sistema nervioso central y en las vesículas presinápticas del plexo mientérico. Estudios inmunohistoquímicos han confirmado su presencia, así como de sus receptores, en los gránulos de terminaciones nerviosas peptidérgicas de células acinares pancreáticas, hepatocitos, células grasas, corazón, útero, glándulas salivares, tejido sinovial, células epiteliales intestinales y sinaptosomas cerebrales (Ottaway y Gordon, 1984; O'Dorisio et al., 1985; Bjurholm, 1990).

Además de estas localizaciones y de su localización en células del sistema APUD, existe la posibilidad de que los leucocitos y mastocitos sinteticen VIP, pues se ha detectado VIP-inmunoreactivo en neutrófilos humanos (O'Dorisio et al., 1985; Lygren et al., 1984) y en mastocitos (Cutz et al., 1978). Entre sus acciones cabe citar la vasodilatación y relajación de la musculatura lisa en sistemas circulatorio, genitourinario, gastrointestinal y pulmonar entre otros.

Varias líneas de investigación apoyan la idea de que el VIP puede actuar como una ligazón entre el sistema nervioso y el sistema inmune, in vivo, ya que tanto órganos linfoides primarios como secundarios poseen inervación peptidérgica (Felten et al., 1985; Ottaway et al., 1987; Gomariz et al., 1990;

Nohr y Weihe, 1991). La presencia de células linfoides que poseen VIP inmunoreactivo, siendo por tanto posibles fuentes de VIP, se ha confirmado en cortex de timo y en áreas T dependientes de bazo y nódulos linfáticos (Gomariz et al., 1992).

Por otra parte se conoce la existencia de receptores para el VIP en linfocitos T y B, así como en macrófagos y monocitos (Guerrero et al., 1981; Danek et al., 1983; Ottaway y Grenberg, 1984; O'Dorisio et al., 1989; Roberts et al., 1991; Segura et al., 1991; Litwin et al., 1992) y localización de VIP en mastocitos (Cutz et al., 1978), neutrófilos (O'Dorisio et al., 1989), plaquetas (Ercal et al., 1988) y eosinófilos (Aliakbari et al., 1987). También se ha comprobado la expresión génica de VIP en linfocitos de bazo y timo de rata (Gomariz et al., 1993; Gomariz et al., 1994).

Estos receptores que median la acción del VIP en linfocitos y monocitos son específicos para el VIP, con un peso molecular de 47 KDa y situados en la membrana plasmática celular. Actúan a través de la activación de la adenilatociclasa, que a su vez es estimulada por la prostaglandina E1 (PGE1) y por el 5-guanidilimidodifosfato [Gpp(NH)p]. Dosis máximas de VIP y PGE1 son aditivas, mientras que el efecto de la combinación de VIP y [Gpp(NH)p] es sinérgico (O'Dorisio et al., 1985; O'Dorisio, 1987; O'Dorisio et al., 1989).

Se ha constatado la modulación que el VIP ejerce sobre el sistema inmune. Así la activación de los linfocitos T y B se ve afectada por este neuropéptido. El VIP inhibe la migración linfocitaria dentro y fuera de los ganglios linfáticos (Ottaway, 1984; Ottaway, 1985; Moore et al., 1988),

inhibe la proliferación linfoide en respuesta a mitógenos como la Con A y PHA (Ottaway y Greenberg, 1984; Stanisiz et al., 1986), inhibe la función quimiotáctica de los monocitos (Ruff et al., 1987; Bondesson et al., 1991) y la quimiotaxis y fagocitosis de los macrófagos alveolares de rata in vitro (Litwin et al., 1992), y, además, es mediador de la liberación de histamina por parte de los mastocitos (Foreman y Piotrowski, 1984).

Por otra parte, también puede modular la actividad de las células "natural killer" (NK); este efecto regulador sobre las células NK humanas es tiempo dependiente y bimodal. Una exposición corta al VIP (30-60 minutos) de las células efectoras antes del ensayo de citotoxicidad desencadena un marcado incremento de la actividad lítica, mientras que una exposición prolongada (4 horas) o persistente produce un efecto inhibitorio de dicha actividad (Rola-Peszczyński et al., 1985; Sirianni et al., 1992).

El VIP también ejerce su acción sobre la secreción de inmunoglobulinas, estimulando la producción de IgA (Stanisiz et al., 1986; Ishioka et al., 1992). Se ha visto que el VIP aumenta un 20% la producción de IgA en ganglios linfáticos mesentéricos y un 30% en el bazo, pero inhibe un 60% la síntesis de IgA en los linfocitos de las placas de Peyer. Por otra parte, incrementa un 80% la síntesis de IgM en las placas de Peyer, no modificando su síntesis en los ganglios linfáticos mesentéricos ni en el bazo. Tampoco la producción de IgG varía en ninguno de los órganos examinados (Stanisiz et al., 1986). Esto demuestra que los neuropéptidos tienen efectos divergentes sobre la producción de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas, y que además tienen efectos organoespecíficos (Ganea

y Sun, 1993).

Sobre las células fagocíticas el VIP ejerce un papel estimulador sobre la fagocitosis y la digestión, incrementando intracelularmente la actividad de la protein-quinasa C (De la Fuente et al., 1993b).

Por otra parte, también estimula la producción de AMPc en los macrófagos peritoneales de rata (Segura et al., 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 et al, 1994a). Además potencia el efecto supresor de la noradrenalina sobre la actividad tumoricida inducida por interferón (Koff y Dunegan, 1985).

Los productos solubles de las células inmunocompetentes, como por ejemplo las citoquinas pueden regular la respuesta inmune, y el efecto modulador de los neuropéptidos como el VIP podrían mediar la síntesis de aquellas. Así, se ha visto que el VIP podría estimular la liberación por células T de IL-5 en la esquistosomiasis murina (Mathew et al., 1992) e inhibir la producción de IL-2 e IL-4 en linfocitos T de ratón estimulados con mitógenos (Ottaway, 1987; Boudard y Bastide, 1991; Ganea y Sun, 1993), sugiriendo éstos últimos autores que esta acción podría estar mediada por el AMPc ya que observan un rápido aumento de su concentración a nivel intracelular (Ganea y Sun, 1993; Sun y Ganea, 1993).

Esta relación entre el VIP y citoquinas como IL-1 β , IL-6 y TNF-alfa todavía no ha sido estudiada en humanos, aunque basándonos en hechos de experimentación animal parecen existir interesantes interacciones entre

ellos.

1.2.4. PEPTIDO LIBERADOR DE GASTRINA

El péptido liberador de gastrina (GRP) fue aislado en el tracto digestivo porcino por McDonald et al. en 1979. El nombre lo recibió por el bioensayo utilizado en su determinación y se ha mantenido, aunque hace mención a uno solo de sus efectos fisiológicos.

El GRP es un péptido de 27 aminoácidos, codificado por un gen situado en el cromosoma 18, que pertenece a la familia del péptido bombesina, presentando homología con ésta en su fragmento C-terminal. 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 (Minamino et al., 1984).

El GRP y la bombesina poseen gran variedad de efectos biológicos, y los estudios realizados a cerca de ellos han demostrado que ambos péptidos actúan de forma semejante (McDonald et al., 1983; Bunnnett, 1994).

El GRP se ha encontrado en el sistema nervioso central, tracto gastrointestinal y pulmón. En el sistema nervioso central, se halló inmunorreactividad positiva en el cerebro de anfibios para la bombesina (Pollak et al., 1976) y posteriormente en extractos de cerebro de cobayas y ratas (Roth et al., 1983; Shaw et al., 1987; Hernanz, 1990).

Se ha comprobado que el GRP ejerce un papel en los mecanismos homeostáticos centrales (McCoy y Avery, 1990), induciendo un efecto hipotérmico (Taché et al., 1980). Otros autores sugieren una acción directa

de este neuropéptido sobre la glándula pituitaria, estimulando la secreción de prolactina y hormona del crecimiento, una acción estimuladora sobre la secreción de muchas hormonas, como la adrenalina, y un papel regulador de la secreción de ácido gástrico y glucemia (Brown et al., 1978; Westendorf et al., 1982; McCoy y Avery, 1990).

Otra importante función del GRP es ser un potente factor de crecimiento de diferentes células tumorales. Es el caso del tumor de células SCLC (small cell lung cancer), en el que el GRP se une a receptores en la superficie de estas células elevando los niveles de Ca^{2+} intracelular, y por tanto estimulando el crecimiento del tumor (Moody y Cuttita, 1993).

En el tracto gastrointestinal, el GRP se localiza en las fibras del plexo mientérico y en el plexo submucoso gástrico e intestinal (Dockray et al., 1979; Hernanz, 1990). Estos hallazgos parecen indicar el probable papel neurotransmisor de este neuropéptido en el tracto digestivo de mamíferos, y se ha comprobado que el GRP estimula la secreción de insulina, glucagón, gastrina, polipéptido pancreático y somatostatina (McDonald et al., 1983). Por otra parte modula la actividad motora, estimulando la contracción del músculo liso gastrointestinal (Taché et al., 1980; McCoy y Avery, 1990) y retrasando el vaciamiento gástrico (Yegen et al, 1996).

El GRP también se localiza en el pulmón. Estudios realizados por Weber (1985) descubren que este neuropéptido es un mitógeno para las células que constituyen el tumor pulmonar de células pequeñas. La mitogenicidad del GRP reside en su fragmento tetradecapéptido carboxiterminal, es decir el que comparte homología con la bombesina y la neuromedina C. Willey

et al. (1984) observan que la bombesina y el fragmento tetradecapéptido C-terminal del GRP estimulan la proliferación de células humanas normales del epitelio bronquial.

También se han encontrado receptores para la BN/GRP en líneas celulares tumorales humanas, concretamente en el glioblastoma humano (U-118) y en un tipo de carcinoma pulmonar (NCI-H720) de los cuales han sido purificados y solubilizados estos receptores (Staley et al., 1993).

En esta misma línea, Patel y Screy (1990) demuestran la implicación de estos neuropéptidos en el carcinoma 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.

Meloni et al. en 1992 demuestran la presencia de estos neuropéptidos en células de la línea monocito-macrófago, aumentando sus niveles en pacientes con bronquitis crónica. Este hecho, junto con su hallazgo en las células del tumor pulmonar de células pequeñas parecen apoyar la idea de que este péptido puede desempeñar un importante papel en la respuesta inmune a enfermedades pulmonares.

Pocos estudios existen sobre la acción que el GRP puede ejercer sobre el sistema inmune, y , según nuestro conocimiento, ninguno de ellos realizado en humanos. Jin et al. (1990) estudiaron el efecto del GRP sobre la función fagocítica en ratones expresado como emisión de quimioluminiscencia, y observaron un incremento de ésta. Este hecho es interpretado como una estimulación de la función fagocítica, ya que los monocitos-macrófagos activados emiten luz debido a un incremento de su

metabolismo oxidativo.

De la Fuente et al. (1991) han estudiado la función moduladora que el GRP y péptidos de su familia podían ejercer sobre la función fagocítica de macrófagos peritoneales murinos. Estos autores demuestran que la interacción de éstos neuropéptidos con los macrófagos peritoneales de ratón origina una estimulación del proceso de fagocitosis a distintos niveles: quimiotaxis, ingestión de células (*Candida albicans*) o partículas inertes (bolas de latex), aumenta la capacidad de digestión del material fagocitado y estimula la actividad citotóxica natural killer.

Del Río et al. (1993) investigaron el efecto de la bombesina, GRP y neuromedina C sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos procedentes de ganglios linfáticos, timo y bazo de ratones. Sus resultados muestran que estos neuropéptidos a concentraciones de 10^{-9} M, 10^{-10} M y 10^{-11} M modulan la respuesta proliferativa e inhiben, en gran medida, la respuesta linfoproliferativa a mitógenos como la Con A. Además el GRP potencia la secreción de IL-1 β por macrófagos peritoneales de ratón (Del Río et al. 1994) pero no la producción de IL-2 por los linfocitos del ratón.

Todos estos hallazgos contribuyen a una mejor comprensión de la complejidad de las interacciones entre neuropéptidos y células del sistema inmune, y de qué forma los neuropéptidos pueden modular el sistema inmune.

1.3. CITOQUINAS Y SUS RECEPTORES EN EL SISTEMA NERVIOSO

La capacidad de los productos inmunes de actuar sobre el sistema nervioso fue sugerido al comprobar que los niveles hormonales se alteraban en respuesta a cambios antigénicos. Por otra parte, estos cambios podían ser inducidos por líquidos sobrenadantes procedentes de leucocitos activados aunque las sustancias efectoras eran desconocidas. Posteriormente otros estudios demostraron que estas moléculas activas eran diferentes que las inmunoglobulinas también producidas por células inmunes, y que estaban implicadas en la comunicación bidireccional entre el sistema nervioso y el sistema inmune.

Esas sustancias se conocen con el nombre de citoquinas o interleuquinas (IL). Las citoquinas producidas por linfocitos se denominan linfoquinas, mientras que las producidas por monocitos y macrófagos se denominan monoquinas. Actualmente se reconocen, al menos, diecisiete clases de citoquinas (IL-1 a IL-17), cada una de las cuales actúa sobre una gran variedad de células diana. Además existen tres clases principales de factores de crecimiento que afectan a granulocitos y macrófagos (G-CSF, M-CSF y GM-CSF) y tres clases de interferones (IFNalfa, IFNbeta e IFNgamma). También están incluidos las fracciones alfa y beta del factor de necrosis tumoral (TNFalfa y TNFbeta) (Tabla 1) (Bellanti et al., 1994; Blalock, 1994).

Las citoquinas son mediadores peptídicos que intervienen en la respuesta inflamatoria, la respuesta inmune, el desarrollo celular y los

procesos de reparación tisular. La importancia clínica de las citoquinas se basa en tres posibles papeles: diagnóstico, tratamiento y prevención de las enfermedades (Balkwill, 1993).

Así la medida de ciertas citoquinas en fluidos corporales es de gran importancia en el diagnóstico de algunas enfermedades. Por ejemplo, la cuantificación de IL-6 en líquido amniótico es de gran valor para algunas infecciones intrauterinas (Romero et al., 1992) y concentraciones elevadas de IL-1, TNFalfa, IL-6 e IL-8 son detectadas en suero en el caso de ciertas enfermedades infecciosas (Cavaillon et al., 1992).

De igual forma, la utilización de citoquinas en el tratamiento de enfermedades se valora, actualmente, de considerable importancia clínica. Estas aplicaciones se pueden observar, principalmente, en dos tipos de situaciones:

1) Cuando existe un déficit en la producción de citoquinas, como por ejemplo en recién nacidos o niños pequeños, en los cuales una terapia sustitutiva parece ser bastante efectiva en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

2) En casos en que existe riesgo de padecer una sepsis.

Una tercera aplicación de las citoquinas es su utilización en la prevención de enfermedades, administrándose como inmunoadyuvantes con ciertas vacunas. Meuer et al. (1989) han demostrado un incremento de la respuesta inmune al HBsAg tras la aplicación de IL-2 a dosis bajas. Más recientemente, estudios in vitro realizados por Hill (1993) han demostrado que el pretratamiento con citoquinas de leucocitos polimorfonucleares

procedentes de neonatos origina un incremento de su actividad quimiotáctica.

Por otra parte, no existe correlación entre su cantidad e importancia. Las citoquinas actúan sobre receptores de alta afinidad cuya expresión está altamente regulada, y que normalmente aumentan de número tras la activación y pueden aumentar o disminuir tras la exposición a un ligando específico. Existen también inhibidores, y por otro lado, además, hay que añadir que las citoquinas interactúan con otros mediadores como eicosanoides y neuropéptidos. Todo ello, sugiere una íntima relación entre las citoquinas y los neuropéptidos (Feldmann et al., 1991; Bellanti et al., 1994).

El modo de acción de las citoquinas es bastante complejo y, su actuación no ocurre de forma aislada. Más aún se origina una cascada de hechos en las células diana, que conlleva el desarrollo de la respuesta inmune. La respuesta a las citoquinas puede tener un efecto proliferativo o de diferenciación y, al mismo tiempo, supresivo e inhibidor. También la interacción de ciertas citoquinas con las células diana puede llevar a la producción de otras citoquinas durante los procesos de interacción (Carding et al., 1991).

De la misma forma que existen receptores de hormonas peptídicas y neurotransmisores en las células del sistema inmune, existen también receptores para las citoquinas en las células del sistema nervioso. Probablemente el sistema nervioso puede producir la mayoría de las citoquinas, al igual que las células inmunocompetentes producen gran

cantidad de neuropéptidos (Owens et al., 1994). Así, muchas de las células neuronales y endocrinas que tienen receptores para, y responden a las citoquinas, también las producen.

Así, se sabe que las células de la microglia, los astrocitos y las neuronas del hipotálamo pueden producir IL-1. Se conoce también que las IL-1 e IL-6 son productos endógenos de la glándula pituitaria (Blalock, 1994). La IL-2 puede ser sintetizada por cultivos de células hipofisarias murinas. Además, el mRNA de IL-3 se puede detectar en áreas concretas del cerebro, incluyendo el hipocampo y cerebelo.

Este escenario de hechos, todos ellos interrelacionados, sugiere una acción autocrina o paracrina y una función endocrina. Por ejemplo, la IL-2 es un regulador negativo autocrino/paracrino de la proliferación de células normales de la glándula pituitaria y un estimulador de la proliferación de las células de la línea GH3 de los adenomas hipofisarios productores de GH. Además, una acción paracrina de la IL-1 en el hipotálamo o hipófisis es sugerida por su capacidad de inducir la síntesis de IL-6 por las células hipofisarias (Blalock, 1994).

Respecto a la función endocrina, la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal durante la respuesta inmune y las reacciones inflamatorias se piensa que es debida, en gran medida, a la acción de la IL-1, actuando ésta como una molécula informativa dentro del cerebro. Parece ser que la IL-1 circulante interactuaría con receptores de IL-1 situados en las células endoteliales de los vasos cerebrales, estimulando secundariamente otras moléculas como, por ejemplo, IL-1, óxido nítrico y/o

prostaglandinas que, a su vez, actuarían localmente sobre las células del sistema nervioso central (Ericsson et al., 1994). Otro ejemplo sería el caso de la IL-2, de la cual se sabe que es el secretagogo más potente para la ACTH, y es más activo que el regulador clásico CRH (Karanth y McCann, 1991).

Todo ello nos hace pensar que las citoquinas pueden actuar como neurotransmisores y mediar en la interrelación entre los sistemas nervioso e inmune. De la misma forma, los neuropéptidos pueden actuar como reguladores endógenos del sistema inmune, completando el comunicación bidireccional entre ambos sistemas.

1.3.1. INTERLEUQUINA 1

La interleuquina-1 (IL-1) es una molécula de 17.500 daltons de peso molecular que es producida principalmente por monocitos y macrófagos, aunque también puede ser secretada por los linfocitos T y B, células endoteliales, mesangiales, queratinocitos y astrocitos (Fontana et al., 1982; Bellanti et al., 1994).

Existen dos formas, la IL-1alfa que actúa principalmente unida a membrana y la IL-1beta que es la forma predominante y se encuentra libre en el sobrenadante.

Las acciones de la IL-1 son variadas, e incluyen manifestaciones sistémicas como fiebre, anorexia y estimulación de reactantes de fase aguda, y efectos locales como estimulación de la función quimiotáctica de leucocitos polimorfonucleares, monocitos y linfocitos, estimulación de

linfocitos T y B, proliferación de fibroblastos, estimulación de la síntesis de otras citoquinas (Bellanti et al., 1994; Blalock, 1994) producción de PGE₂, colagenasa y proteasas neutras por fibroblastos y condrocitos, producción de colágeno tipo I y III e inhibidores de proteasas neutras (Arend y Dayer, 1990; Feldmann et al., 1991).

En el sistema nervioso, la IL-1 tiene un efecto pirógeno debido a su acción sobre el hipotálamo a través de receptores opioides (Norman et al., 1986). Estimula la liberación de CRF y prostaglandinas (Guaza y Borrell, 1993), la biosíntesis de somatostatina (Scarborough et al., 1989) e incrementa la liberación de ACTH actuando directamente a nivel pituitario o bien estimulando la liberación de CRF hipotalámico (Uehar et al., 1987; Cambronero et al., 1992), así como de LH, GH y TSH (Bernton et al., 1987). También actúa sobre el sistema nervioso simpático estimulando la producción de catecolaminas (Haefeli et al., 1993).

La respuesta de las neuronas hipotalámicas y células hipofisarias a la IL-1 se cree que es debido a que las células neuroendocrinas pueden expresar receptores para la IL-1 (IL-1Rs). Existen evidencias de la presencia de IL-1Rs de tipo I y II, y sus respectivos mRNAs, en el sistema nervioso central y, más concretamente, en la hipófisis. En estos tejidos, los IL-1Rs están regulados por la propia IL-1 y por endotoxinas bacterianas, y, además, en la glándula pituitaria por el CRF.

Esta profunda interacción entre la IL-1 y las estructuras del sistema nervioso, conlleva una profunda influencia mutua lo cual es, sin lugar a dudas, muy importante para una adecuada homeostasis entre los sistemas

inmune y nervioso (Blalock, 1994).

1.3.2. INTERLEUQUINA 6

La interleucina-6 (IL-6) es una molécula de 25.000 daltons de peso molecular, producida por monocitos, macrófagos y fibroblastos. Su efecto fundamental es inducir la proliferación y diferenciación de los linfocitos T. También es un potente inductor de la síntesis de reactantes de fase aguda en el hígado, más potente que la IL-1 y que el TNF. Por otra parte, bloquea la producción de PGE2 inducida por la IL-1.

La IL-6 se ha relacionado con patologías del sistema nervioso central producidas por virus (Frei et al., 1988; Van Damme et al., 1989) y estimula la secreción de las hormonas hipofisarias PRL, GH y LH (Spangelo et al., 1989), bien actuando directamente sobre la hipófisis o estimulando la liberación de los respectivos factores liberadores hipotalámicos (Payne et al., 1994). La presencia de receptores para la IL-6, así como de sus mRNAs, en las neuronas, sugiere un papel de la IL-6 en la neurotransmisión.

Se ha visto que la IL-6 induce la proliferación de células B activadas, así como la producción de anticuerpos frente a agentes causantes de determinadas patologías, como la esclerosis múltiple o artritis reumatoide. Otros trabajos también demuestran que la IL-6 es capaz de inducir la síntesis de TIMP, un potente inhibidor de metaloproteinasas, lo cual podría limitar la producción de péptidos encefalitogénicos (Opdenakker y Van Damme, 1994).

Se encuentra en elevadas concentraciones en los líquidos inflamatorios, superando los niveles de IL-1 y TNF. Así se ha visto aumentada tanto en el plasma como en el líquido sinovial de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, aunque también se han encontrado concentraciones de IL-6 ligeramente altas en la osteoartritis (Arnalich et al., 1993).

Por otra parte parece existir un efecto del envejecimiento sobre la síntesis de IL-6 (Ershler, 1988). Fagiolo et al.(1992) observaron un aumento de sus niveles en cultivos de células mononucleares de sangre periférica pertenecientes a personas ancianas respecto a cultivos realizados con células de adultos jóvenes. En este sentido, Arnalich et al (1994) también demostraron una sobreproducción de IL-6 en ancianos anoréxicos y ancianos sanos, pero no en adultos sanos.

1.3.3. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

La caquectina o factor de necrosis tumoral (TNF) es un péptido de 17.000 daltons de peso molecular, producido principalmente por linfocitos, queratinocitos y células endoteliales. También es sintetizado por macrófagos y monocitos, células "natural killer" y células de Kupffer en el hígado. En el sistema nervioso es producido por astrocitos activados y células de la microglia (Chofflon et al., 1992).

Es producido en respuesta a diversos estímulos invasivos y nocivos, y media efectos biológicos beneficiosos o perjudiciales dependiendo de la cantidad producida, duración de la liberación y medio bioquímico de las células que responden a sus estímulos (Tracey et al., 1989).

En el sistema nervioso inhibe la secreción de hormonas hipofisarias como la GH, LH y PRL (Walton y Cronin, 1989; Gaillard et al., 1990). Además parece intervenir en la modulación de la secreción folicular de progesterona y estradiol (Punnonen et al., 1992). Por otra parte, también está implicado en el desarrollo neuronal (Mohamad et al., 1991; Merrill, 1992).

Su papel en la respuesta inflamatoria viene dado por la gran variedad de estímulos que pueden disparar su liberación, por ejemplo endotoxinas bacterianas, lipopolisacárido, enterotoxinas, micobacterias, virus, antígenos parasitarios, IL-1, etc..., y de una manera autocrina el propio TNF (Tracey et al., 1989; Evans et al., 1989; Mohammad et al. 1991; Bellanti et al., 1994).

El TNF actúa bien directamente sobre las células a través de receptores específicos (Tartaglia y Goeddel, 1992) o indirectamente induciendo la síntesis y liberación de otros mediadores y citoquinas, como la IL-1 (Dinarello, 1992), IL-6 y prostaglandinas (Brito et al., 1995).

El TNF no sólo activa los monocitos y macrófagos aumentando la producción de mediadores inflamatorios, sino también estimula la adherencia de células inflamatorias al endotelio y su migración a los lugares de inflamación (Tracey y Cerami, 1994).

Existen dos tipos de receptores humanos para el TNF con un peso molecular de 55kDa (p55) y 75 kDa (p75). El receptor p55 se expresa fundamentalmente en células epiteliales, mientras que las células linfoides y mieloides expresan ambos receptores (Tartaglia y Goeddel, 1992; Winzen

et al., 1992; Gehr et al., 1992). Están esparcidos por la superficie celular, y la forma soluble de cada uno de ellos inhibe la acción del TNFalfa tanto in vivo como in vitro (Tartaglia y Goeddel, 1992). Recientemente Leeuwenberg et al. (1994) en un estudio con células inflamatorias, principalmente monocitos, linfocitos y neutrófilos demostraron que los receptores del TNF-alfa eran liberados rápidamente de los neutrófilos activados, mientras que la liberación en los monocitos era mucho más lenta, alcanzando un nivel a partir del cual ya no se incrementaba, aproximadamente a los dos días después de la activación. Así, la cantidad de receptores emitida por los linfocitos y neutrófilos fue mucho menor que la liberada por los monocitos.

En respuesta al lipopolisacárido los procesos de traslación y transcripción de sus precursores son estimulados, sintetizándose y liberándose grandes cantidades de proteína madura, principalmente por células del sistema mononuclear-fagocitario (Heumann et al., 1992; Pollack et al., 1995).

Después de la administración intravenosa de endotoxina/LPS, se produce la liberación de TNF siendo máxima al cabo de 2 horas, coincidiendo con la aparición de las primeras manifestaciones del shock séptico (fiebre, mialgias, dolor de cabeza, náuseas, etc...). Este efecto nocivo del TNF es causado también por la liberación de mediadores, incluyendo otros péptidos reguladores y eicosanoides (Tracey et al., 1989; Brito et al., 1995).

El proceso de biosíntesis del TNF es inhibido por la dexametasona, aunque este efecto no ocurre si previamente las células son expuestas a la acción del activador policlonal LPS. Por otra parte, el interferon gamma ejerce un

efecto permisivo sobre la producción del TNF, incrementándose su síntesis. Esta regulación positiva ejercida por el interferón gamma o negativa debida a la dexametasona, parece contribuir a los efectos pro-inflamatorios o anti-inflamatorios de esos mediadores (Kriegler et al., 1988).

Las propiedades biológicas del TNF incluyen, paradójicamente, efectos destructivos y de reconstrucción que pueden contribuir a la remodelación de componentes tisulares (Opdenakker y Van Damme, 1994). Como factor de crecimiento, puede estimular directamente la proliferación de fibroblastos y células mesenquimales, e inducir la síntesis de otros factores de crecimiento. Como mediador destructivo, ejerce un efecto citotóxico directo sobre las células endoteliales y algunas líneas celulares, e induce la síntesis de colagenasas, proteasas y metabolitos del ácido araquidónico.

Las proteínas tisulares de vida media larga tienden, con el tiempo, a acumular proteínas derivadas de la glucosa a través de reacciones de glicosilación no enzimáticas (Brownlee et al., 1988). Los macrófagos poseen receptores que reconocen específicamente estas proteínas modificadas, recaptándolas y degradándolas. Este proceso dispara la secreción por parte de los macrófagos del TNF y la IL-1, que a su vez amplifican los mecanismos de degradación y reparación del remodelamiento tisular normal (Vlassara et al., 1988).

Estos efectos fisiológicos del TNF presentan un alto grado de conservación a lo largo del tiempo, aunque ciertos hechos pueden modificarlos. Así, por ejemplo, la diabetes mellitus y el envejecimiento conllevan un imbalance de este sistema de regulación originando un incremento en la acumulación de

proteínas modificadas y, como consecuencia, las citoquinas liberadas contribuyen a que se produzca una respuesta proliferativa y degenerativa tisular inadecuada (Tracey et al., 1989).

Además de la forma activa del TNF secretada a la circulación principalmente en los procesos de endotoxemia, existen otras formas transmembrana que poseen también actividad como mediadores paracrinos. Así, el TNF interactúa con receptores de membrana de alta afinidad situados en tejidos normales, incluyendo hígado, músculo, pulmón, vesícula y riñón. El complejo receptor-ligando es internalizado y degradado, aunque los detalles de la respuesta post-receptor todavía no está totalmente aclarada (Debets y Savelkoul, 1994).

1.4. OTROS MEDIADORES DE LA RESPUESTA INMUNE

1.4.1. LEUCOTRIENO B₄

Los leucotrienos son ácidos grasos hidroxilados sintetizados a partir del ácido araquidónico por la vía de la lipooxigenasa. Junto con los hidroperóxidos, las prostaglandinas, los tromboxanos y las lipoxinas integran un conjunto de compuestos derivados del ácido araquidónico, denominados eicosanoides.

El ácido araquidónico es un componente de los fosfolípidos de las membranas celulares, sobre el que puede actuar la ciclooxigenasa dando lugar a prostaglandinas y tromboxanos, o bien la lipooxigenasa que da origen a hidroperóxidos, leucotrienos y lipoxinas (Mayatepek y Hoffmann, 1995).

La acción de la lipooxigenasa conduce por un lado a la síntesis del ácido 12-hidroxiperoxi-eicosa-tetranoico (12-HPETE), que después de la acción de una peroxidasa se convierte en 12-hidroxi-eicosa-tetranoico (12-HETE). Otra vía es la síntesis del ácido 5-hidroxiperoxi-eicosa-tetranoico (5-HPETE) por medio de la activación de la 5-lipooxigenasa Ca^{+2} dependiente, y a partir del cual se van a formar los leucotrienos A, B, C, D, y E. Respecto al leucotrieno B₄ (5S, 12R-dihidroxi-6,8,11,14-eicosatetranoato), éste se forma por la acción enzimática de una hidrolasa sobre el 5-HPETE (Samuelsson et al., 1987).

Los leucotrienos son producidos, predominantemente, por macrófagos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos (Williams et al., 1984; Verhagen et al., 1984; Lewis et al., 1990). Además, las células endoteliales, plaquetas, linfocitos y eritrocitos también pueden sintetizar leucotrieno B₄ a partir de leucotrieno A₄ (Dahinden y Wirthmueller, 1990; Feinmark, 1990; Jones y Fitzpatrick, 1990).

El leucotrieno B₄ es un metabolito dihidroxilado del ácido araquidónico. Es un potente estimulador del movimiento quimiotáctico y quimiocinético de los leucocitos polimorfonucleares, induciendo la desgranulación y liberación de enzimas lisosomales por estas células, tanto en humanos como en animales de experimentación. Además induce la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales de las vénulas postcapilares y la agregación de células polimorfonucleares.

El leucotrieno B₄, además de ser un potente mediador endógeno de la respuesta inflamatoria y alérgica (Palmlblad et al., 1984), posee los

siguientes efectos biológicos (Lewis et al. 1990; Mayatepek y Hoffmann, 1995):

- Efectos quimiotácticos sobre polimorfonucleares y macrófagos, estimulando la liberación de enzimas lisosomales y la producción de anión superóxido.

- Favorece la adhesión y la migración transendotelial de los neutrófilos.

- Modula la función linfocitaria.

- Interviene en la producción y acción de la citoquinas.

- Incrementa la permeabilidad vascular, en presencia de prostaglandina

E2.

- Incrementa la expresión del receptor C3b y la citotoxicidad complemento dependiente.

- Libera el calcio intracelular.

- Aumenta la síntesis de AMPc y GMPc.

Las concentraciones de leucotrieno B4 en fluidos biológicos son muy bajas, a nivel nanomolar o picomolar, y además, tienen una vida media in vivo muy corta, de ahí la dificultad en su cuantificación.

Los leucotrienos fácilmente sufren degradación oxidativa durante la preparación de la muestra y, además se pueden generar artificialmente y ser liberadas in vitro a partir de leucocitos durante el manejo de la muestra.

Por todo ello, su análisis en plasma suministra poca información y no es una manera fiable de evaluar el papel de los leucotrienos en determinadas condiciones patológicas. Sin embargo la producción de leucotrienos, principalmente de leucotrieno B4, a partir de células blancas de sangre

periférica puede ser útil para obtener información a cerca del papel de estas sustancias en estados patológicos (Mayatepek et al., 1993a; Mayatepek et al., 1993b; Mayatepek et al., 1994).

El método más adecuado para determinar leucotrieno B4 parece ser estimular su producción mediante activadores como, por ejemplo, el ionóforo de calcio A23187, zymosan y diversos antígenos o agregados de inmunoglobulinas (Mayatepek y Hoffmann, 1995).

En este estudio, para comprobar el papel del leucotrieno B4 en la respuesta inmune hemos estimulado su producción con el activador policlonal LPS. Por otra parte, investigamos también si su síntesis es estimulada, inhibida o no sufre modificaciones tras añadir a las muestras diversos neuropéptidos a concentraciones fisiológicas.

1.4.2. NEOPTERINA

La neopterina (6-[1',2',3'-D-eritro-trihidroxi]propilpterina) es una pirazino-pirimidina derivada del guanidin-trifosfato (GTP). Representa un producto intermedio en la síntesis de la biopterina. La biopterina es un cofactor esencial en la síntesis de neurotransmisores. (1,2,3)tetrahidrobiopterina es el cofactor de la hidroxilación enzimática de la fenilalanina, tirosina y triptófano. La tetrahidrobiopterina se ha identificado también como un co-activador de la estimulación linfocitaria. La neopterina, similar a otras pterinas, existe tanto en humanos como en animales y plantas (Wachter et al., 1989).

La respuesta inmune in vitro e in vivo se asocia constantemente a

niveles aumentados de neopterinina. In vitro, la neopterinina es liberada por las células mononucleares de sangre periférica humana tras ser estimuladas por aloantígenos, células autólogas modificadas por virus o por agentes químicos o lecitinas autogénicas. In vivo, la excrección de neopterinina aumenta en pacientes afectados por infecciones víricas, bacterianas o protozoarias, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, rechazo agudo de injertos, SIDA y en ciertas neoplasias (Fuchs et al., 1992). El aumento de los niveles de neopterinina generalmente es previo a las manifestaciones clínicas y se correlacionan con una fase activa de la enfermedad subyacente. En las enfermedades infecciosas, este aumento precede a la presencia de anticuerpos detectables (Drenth et al., 1995).

Las pteridinas, incluyendo la neopterinina, se asocian con los linfocitos T. La neopterinina se produce en cultivos de linfocitos T humanos altamente purificados, estimulados por aloantígenos o por células autólogas modificadas por agentes víricos o químicos. La neopterinina liberada requiere la presencia de células del sistema mononuclear fagocitario. Así, la activación in vitro de macrófagos origina la síntesis de neopterinina, que es inducida por el interferón-gamma producido, a su vez, por linfocitos T activados. La naturaleza del papel de la neopterinina en los mecanismos de defensa inmunes es, por el momento, desconocida (Fuchs et al., 1988).

Debido a la implicación de la neopterinina en las reacciones inmune, la cuantificación de sus niveles es un indicador inmediato y sensible para monitorizar la activación de linfocitos T y macrófagos. Un incremento en la concentración de neopterinina aporta información a cerca del grado de

activación de la inmunidad mediada por células (CMI), lo cual es difícilmente obtenible por otras vías. En varias enfermedades, un aumento de la excreción de neopterina precede a las manifestaciones clínicas y se correlaciona con la actividad de la enfermedad subyacente. Así, la neopterina aparece como un marcador útil e innovador de una gran variedad de estados patológicos (Reibnegger et al., 1991).

Después de un trasplante de corazón, niveles bajos y estables de neopterina se asocian invariablemente a situaciones no complicadas inmunológicamente y, al contrario, los niveles elevados o un incremento paulatino de ellos se asocian a rechazo agudo, infecciones o la supresión de la ciclosporina. La determinación diaria simultánea de la concentración de neopterina en suero y orina tras un trasplante de corazón supone la rápida detección de complicaciones inmunes y puede reducir el número de biopsias (Kronberger et al., 1995).

En los trasplantes de riñón, la neopterina suele elevarse unos días antes de que aumenten los niveles de creatinina, indicando un posible rechazo del injerto. Aunque los niveles de neopterina también pueden aumentar con las infecciones tanto víricas como bacterianas, su determinación es un marcador de la respuesta inmune y puede alertar al clínico sobre la supervivencia de un riñón trasplantado (Fuchs et al., 1992).

También en los trasplantes de médula ósea se ha visto la utilidad de la cuantificación de neopterina en orina, siendo un indicador sensible de la respuesta inmune, sobre todo en la enfermedad injerto contra huésped. Tras el tratamiento exitoso con corticoides de esta situación, los niveles de

neopterina dejan de aumentar, excepto si el rechazo ha sido originado por citomegalovirus, ya que en este caso los corticoides no inducirían este efecto. Por otra parte, nuevos aumentos de neopterina se asocian a complicaciones clínicas, bien infección o rechazo, pudiendo preceder a la aparición de manifestaciones clínicas en días o semanas (Samsonov et al., 1992).

Además, altos valores de neopterina se han asociado también a mal pronóstico en la gammapatía monoclonal, carcinoma hepatocelular y cáncer ginecológico, esclerosis múltiple, así como para diferenciar el hígado graso de los estados crónicos de la hepatitis no-A no-B. En la enfermedad de Alzheimer se ha observado una alteración en la conversión de neopterina en biopterina (ratio N/B elevado),coincidiendo con fases severas de la enfermedad. En el SIDA, la elevación de sus niveles ocurre en las fases más tempranas, antes de que los efectos de las subpoblaciones de células T se puedan detectar, siendo la cronificación de los niveles altos una garantía de susceptibilidad (Carstens et al., 1995; Wachter et al., 1989).

Junto con otros inmunomoduladores (interferones alfa, beta y gamma, citoquinas, factor de necrosis tumoral, etc...), su potencial aplicación en los estados donde la respuesta inmune está alterada es amplia, y por ello nos ha parecido interesante conocer su status en los diferentes grupos del estudio, así como su variación con otros reguladores de la respuesta inmune, como son el neuropéptido Y, somatostatina, péptido intestinal vasoactivo y péptido liberador de gastrina.

FIGURA 1
COMUNICACION ENTRE SISTEMAS
NERVIOSO, INMUNE Y ENDOCRINO

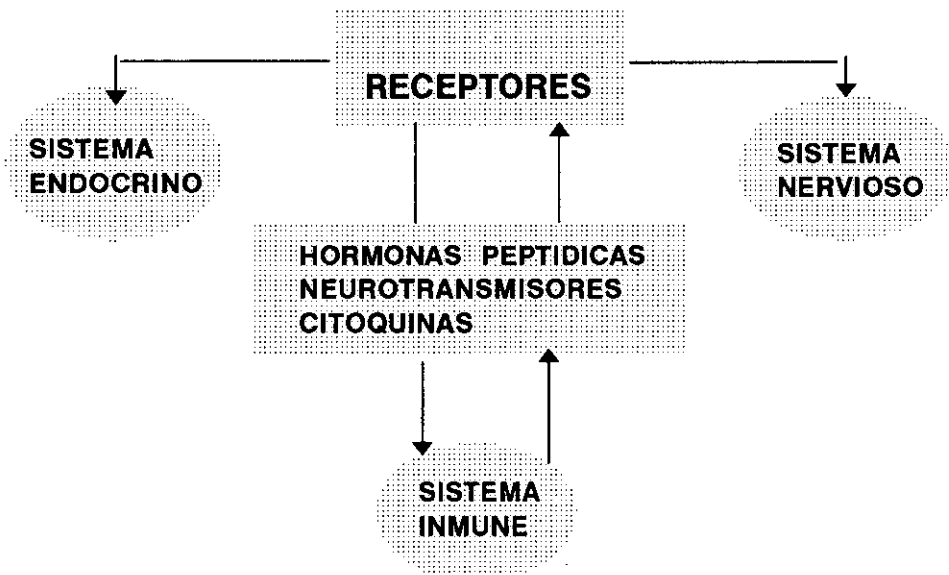


TABLA I TIPOS DE CITOQUINAS

Tipo	Citoquina
Interleuquinas	IL-1 a IL-17
Factores de crecimiento hematopoyéticos	G-CSF M-CSF GM-CSF
Interferones	IFN-alfa IFN-beta IFN-gamma
Otras	TNF-alfa TNF-beta

TABLA II EFECTOS PRINCIPALES DE LA IL-1 β , IL-6 Y TNF-ALFA

	IL-1 β	IL-6	TNF-alfa
Peso molecular (dalt)	17500	25000	17000
Fuentes celulares primarias	Macrófagos, NK, células B	Células T, Fibroblastos	Macrófagos
Actividad	Estimula inmunidad	Estimula inflamación Proliferación cels T	Inflamatoria Tumoricida
Principales efectos	Inflamatorio Hematopoyético	Factor crecim. cels B Produc. Ig policlonales Inflamatorio	Necrosis tumoral Estimula células fagocitarias Anorexia Inflamatorio Trombosis vascular

OBJETIVOS

El proceso de envejecimiento se asocia a una disfunción inmune compleja y multifactorial que permanece todavía incompletamente aclarada. Junto a una atenuación en la respuesta de inmunidad celular debido a una inhibición funcional de los linfocitos T, existe una disregulación de la interacción neuroinmune que ha sido exclusivamente estudiada en modelos animales, pero no en seres humanos. Por este motivo nos proponemos en este trabajo analizar algunas de las características de la interacción neuroinmune en ancianos sanos, así como en un grupo de ancianos diabéticos no insulín-dependientes por ser ésta una situación en la que, frecuentemente, se observa una anormal respuesta de inmunidad celular.

Podemos formular nuestros objetivos del siguiente modo:

1. Estudiar la liberación de algunos mediadores de la respuesta inmune, tales como las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF-alfa y leucotrieno B4 y neopterina, en respuesta a cuatro diferentes neuropéptidos (Neuropéptido Y, Somatostatina, Péptido Intestinal Vasoactivo y Péptido Liberador de Gastrina) en leucocitos de sangre periférica de ancianos sanos y diabéticos no insulín-dependientes, y comparar los resultados obtenidos con los de un grupo control de adultos jóvenes sanos.
2. Comprobar si estos neuropéptidos pueden ejercer un efecto modulador de la liberación de citoquinas proinflamatorias, leucotrieno B4 y neopterina, cuando actúan conjuntamente con la molécula de lipopolisacárido (LPS), que es un conocido activador policlonal de la respuesta de macrófagos y linfocitos T.

MATERIAL Y METODOS

3.1. PACIENTES

3.1.1. POBLACION DE ESTUDIO

Hemos estudiado una muestra de población constituida por:

- 1) grupo de adultos jóvenes que incluye 10 sujetos sanos con una edad de 27 ± 2 años
- 2) grupo de ancianos sanos constituido por 10 sujetos con una edad media de 74 ± 6 años
- 3) grupo de ancianos diabéticos constituido por 10 pacientes (73 ± 9 años de edad) con diabetes mellitus no insulíndependiente (DMNID), procedentes de la Consulta Externa del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario La Paz.

El diagnóstico de DMNID se estableció de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), es decir: 1) glucemia basal en ayuno mayor o igual a 7,8 mmol/L, ó 2) glucemia mayor o igual a 11,1 mmol/L a las 2 horas de sobrecarga oral de 75 gramos de glucosa (World Health Organization Expert Committee (1980). Todos los pacientes recibían tratamiento con sulfonilureas y en el momento de ser incluidos en este estudio tenían una glucemia basal en ayunas comprendida entre 9 y 12 mmol/L y una insulíndemia entre 190 y 230 pmol/L. Ninguno de ellos reunía los criterios establecidos para definir la obesidad, es decir un sobrepeso igual o superior a un 20% por encima del peso ideal, lo que equivale a un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 27 kg/m^2 en varones y mayor o igual a $26,9 \text{ kg/m}^2$ en mujeres (Stern et al., 1990).

Se estudiaron los siguientes parámetros antropométricos: peso, talla, índice de masa corporal (IMC), índice de cintura-cadera (ICC), perímetro cutáneo tricipital (PCT) y circunferencia muscular del brazo (CMB), que fueron medidos conforme a criterios previamente establecidos (Frisancho, 1981;

Burton y Foster, 1985).

Los individuos incluidos en los grupos control se seleccionaron prospectivamente tras descartar cualquier enfermedad mediante exámenes clínicos y analíticos.

El grupo de ancianos sanos incluye 10 sujetos de similar edad y estado nutricional (con IMC inferior a 27,2 en varones y 26,9 en mujeres), con glucemia basal en ayunas inferior a 7,8 mmol/L, función hepática y renal normales, que carecían de síntomas o signos de enfermedad y no tomaban medicación alguna. En el grupo de 10 adultos jóvenes sanos tampoco existía obesidad, ni datos de intolerancia glucídica o enfermedad alguna, y no habían recibido medicación.

Todos los sujetos fueron informados del estudio, mostrando su conformidad por escrito.

3.1.2. MUESTRA DE ESTUDIO

A todos los individuos del estudio se les extrajo 25 mL de sangre periférica tras 12 horas de intervalo postprandial nocturno, entre las 9 y 10 horas de la mañana para evitar la influencia de ritmos circadianos en las concentraciones de los parámetros a determinar.

Las muestras se recogieron en tubos con EDTA (Boehringer Mannheim) e inmediatamente se colocaron en hielo. El intervalo entre la recogida de la muestra y el procesamiento de la misma nunca fue superior a 30 minutos.

3.2. METODOS

3.2.1. Manipulación de las muestras de sangre

3.2.2. Protocolo de incubación

3.2.3. Determinación de citoquinas

3.2.4. Determinación de leucotrieno B₄

3.2.5. Determinación de neopterinina

3.2.6. Análisis estadístico

3.2.1. MANIPULACION DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

La sangre recogida fue diluía 1/2 con el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) sin glutamina y distribuía en tubos de plástico de 1mL. Para evitar el crecimiento de microorganismos se añadieron a cada tubo 10 µL de un preparado antibiótico formado por 250 U/mL de Penicilina y 0,25 µg/mL de estreptomina (50000 U/ml de Penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, Boehringer Mannheim).

Por otra parte, el activador policlonal Lipopolisacárido (LPS, procedente de *E. coli* con un índice de estimulación de 31,3 a 15,6 µg/mL, Sigma) se añadió a algunos tubos como control positivo o bien para comprobar el efecto que ejercían los neuropéptidos sobre la acción propia del LPS. La concentración final de LPS añadida fue de 25 µL/mL.

Para valorar la modulación ejercida por los neuropéptidos, neuropéptido Y (NPY, Sigma), somatostatina (SS, Sigma), péptido liberador de gastrina (GRP, Sigma) y péptido intestinal vasoactivo (VIP, Sigma) sobre la síntesis de citoquinas, cada uno de ellos fue adicionado a distintos tubos con o sin LPS de la muestra a estudio. Las concentraciones finales de los distintos neuropéptidos, fueron seleccionadas por ser consideradas por algunos autores

como fisiológicas y producir un mayor efecto sobre la respuesta inmune celular (De la Fuente et al., 1991; De la Fuente et al, 1993a; De la Fuente et al., 1993b; Del Río et al., 1994; Delgado et al., 1995). Así el NPY, SS y GRP se añadieron a una concentración final de 10^{-10} M y el VIP a una concentración final de 10^{-9} M.

Todas las alíquotas de cada paciente o sujeto control se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO_2 al 5%. Los tiempos de incubación fueron 30 minutos y 4 horas para comprobar si la respuesta en la producción de citoquinas a los neuropéptidos era una respuesta temprana o tardía. Los tiempos de incubación para leucotrieno B4 y neopterinina fueron de 30 minutos.

Después de los tiempos de incubación indicados arriba, o inmediatamente en caso de las muestras basales, cada alícuota se centrifugó a 900 g durante 10 minutos, para separar y posteriormente descartar las células. Los sobrenadantes se separaron y congelaron a -70°C hasta la determinación de los distintos parámetros bioquímicos objeto del estudio.

3.2.2. PROTOCOLO DE INCUBACION.

Tras el minucioso proceso de manipulación, el estudio de cada paciente siguió este protocolo de ensayo:

- 1) Alícuota basal o sin período de incubación
- 2) Alícuota control
- 3) Alícuota conteniendo LPS
- 4) Alícuota conteniendo NPY 10^{-10} M
- 5) Alícuota conteniendo NPY 10^{-10} M + LPS
- 6) Alícuota conteniendo SS 10^{-10} M
- 7) Alícuota conteniendo SS 10^{-10} M + LPS

- 8) Alícuota conteniendo GRP 10^{-10} M
- 9) Alícuota conteniendo GRP 10^{-10} M + LPS
- 10) Alícuota conteniendo VIP 10^{-9} M
- 11) Alícuota conteniendo VIP 10^{-9} M + LPS

3.2.3. DETERMINACION DE CITOQUINAS

3.2.3.1. Cuantificación de interleuquina 1 B (IL-1B) e interleuquina 6 (IL-6).

Se realizó mediante enzimoimmunoensayo (Medgenix Diagnostics) siguiendo el protocolo recomendado para medios de cultivo con algunas modificaciones:

	Standars	Controles-muestras
(μ L)	(μ L)	
Standards (0-5)	200	-
Controles-muestras	-	200
Anti IL-1B-HRP	50	50

Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente agitando continuamente (500 rpm).

Aspirar el contenido de cada celdilla.

Lavar 3 veces con 0,4 mL de solución de lavado y aspirar.

Añadir (μ L):

Solución sustrato	200	200
-------------------	-----	-----

Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente agitado continuamente (500 rpm). Añadir (μ L):

Acido sulfúrico 0.5M	50	50
----------------------	----	----

Lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

La concentración de los estándares utilizados fue de 0-50-150-500-1000-

2000 pg/mL para la IL-1B y de 0-6.25-25-50-100-300 pg/mL para la IL-6.

La sensibilidad o concentración mínima detectable del ensayo fue de 2 pg/mL para ambas citoquinas y el anticuerpo utilizado no presentó reacciones cruzadas o bien eran insignificantes con otras citoquinas.

Los coeficientes de variación intraensayo fueron de 2.8% y los coeficientes de variación interensayo fueron de 4.5% para ambos parámetros.

3.2.3.2. Cuantificación de TNFalfa.

La fracción alfa del factor de necrosis tumoral también llamada caquectina se valoró mediante enzimoimmunoensayo (Medgenix Diagnostics). El protocolo seguido fue el recomendado para medios de cultivo con algunas modificaciones:

	Estándares (μ L)	Controles-Muestras (μ L)
Estándares (0-5)	200	-
Controles-Muestras	-	200
Buffer incubación	50	50

Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente agitando continuamente (500 rpm).

Aspirar el contenido de cada celdilla.

Lavar 3 veces con 0.4 mL de solución de lavado y aspirar.

Añadir (μ L):

Estándar 0	100	100
Anti TNFa-HRP	50	50

Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente agitando continuamente (500 rpm).

Aspirar el contenido de cada celdilla.

Lavar 3 veces con 0.4 mL de solución de lavado y aspirar.

Añadir:

Solución sustrato	200	200
-------------------	-----	-----

Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente agitando continuamente (500 rpm). Añadir (μL):

Acido sulfúrico 0.5M	50	50
----------------------	----	----

Lectura en espectrofotómetro con una longitud de onda de 490 nm.

Las concentraciones de los estándares fueron 0-20-45-110-330-1060 pg/mL. La sensibilidad o concentración mínima detectable del ensayo fue de 3 pg/mL. No se observaron reacciones cruzadas con anticuerpos de otras citocinas. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo presentados fueron del 3.4% y 9.2% respectivamente.

3.2.4. CUANTIFICACION DE LEUCOTRIENO B4.

El leucotrieno B4 se cuantificó mediante enzimoimmunoensayo (Biotrak Amersham) diseñado específicamente para investigación. Para ello se combina el uso de peroxidasa marcada a un conjugado de leukotrieno B4 un anticuerpo inmovilizado a las paredes de las celdas de la placa del ensayo y una solución estabilizante. El método proporciona una sensibilidad de 6 pg/mL un coeficiente de variación intraensayo de 7.9% y un coeficiente de variación interensayo de 9.0%.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

	Blanco	NSB	Estándar 0	Estándares	Muestra
	(μL)	(μL)	(μL)	(μL)	(μL)
Buffer	-	100	50	-	-
Estándares	-	-	-	50	50
Muestras	-	-	-	-	50
Anticuerpo	-	-	50	50	50

Incubar 2 horas a 15-25 °C agitando continuamente.

Añadir:

	Blanco	NSB	Estándar 0	Estándares	Muestra
	(μ L)	(μ L)	(μ L)	(μ L)	(μ L)
Peroxidasa					
conjugada	-	50	50	50	50

Incubar 1 hora a 15-25°C agitando continuamente.

Aspirar y lavar 3 veces con 0.3 mL de buffer lavado.

Añadir:

Sustrato	150	150	150	150	150
----------	-----	-----	-----	-----	-----

Incubar 30 minutos a 15-25 °C agitando continuamente.

Añadir:

Ac.Sulf.0.5M	100	100	100	100	100
--------------	-----	-----	-----	-----	-----

Agitar y medir a una longitud de onda de 450 nm.

3.2.5. CUANTIFICACION DE NEOPTERINA.

Se valoró mediante radioinmunoensayo (Neopterin ¹²⁵I RIA ICN Biomedicals, Inc.) diseñado para investigación. Se siguió el siguiente protocolo:

	NSB	Estándar 0	Estándares	Muestra
	(μ L)	(μ L)	(μ L)	(μ L)
Buffer	100	-	-	-
Estándares	20	20	20	-
Muestras	-	-	-	20
Neopterin ¹²⁵ I	100	100	100	100

Agitar en vortex

Anti-neopterinina - 100 100 100

Agitar en vortex

Incubar 60 minutos a temperatura ambiente.

Sol. precipitante 1 mL 1mL 1 mL 1 mL

Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm.

Aspirar o decantar.

Medir la radiactividad en un contador gamma calibrado para ^{125}I .

Las concentraciones de los estándares utilizados fueron 0-0.5-1.5-3-6-12-24-100 ng/mL. La sensibilidad del ensayo está estimada en 0.05 ng/mL. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo son de 8.8% y 7.3%, respectivamente.

3.2.6. ANALISIS ESTADISTICO.

Se utilizó un ordenador Macintosh con el programa Statview+ Graphics.

La comparación entre resultados se realizó mediante los tests de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney para datos no apareados, cuando los datos no seguían una distribución normal. Si estaban normalmente distribuidos se utilizaron los tests de ANOVA y F de Scheffe para datos no apareados.

Los datos pareados se examinaron mediante el test ANOVA para 1 factor con mediciones repetidas de datos paramétricos y el test F de Scheffe para comparaciones entre 2 grupos. Los valores no paramétricos se evaluaron mediante el test de Friedman para resultados pareados y el test de los signos de Wilkonson para comparaciones entre 2 grupos.

Las correlaciones entre 2 variables se estudiaron mediante regresión lineal simple utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando "p" fue menor de 0.05 ($p < 0.05$).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar de la media ($\bar{x} \pm DS$) del número de experimentos realizados por duplicado.

RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN

4.1.1. EDAD Y SEXO

Las medias de edad de los tres grupos de individuos estudiados son de 73 años en los pacientes diabéticos, 74 años en los ancianos sanos y 27 años en los adultos jóvenes sanos (Tabla III).

El conjunto de pacientes diabéticos estaba formado por 5 varones y 5 mujeres, mientras que en el de ancianos sanos y adultos jóvenes sanos existía un ligero predominio de varones (6 varones versus 4 mujeres y 7 varones versus 3 mujeres, respectivamente) (Tabla III).

4.1.2. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS

Las características antropométricas de los ancianos sanos y adultos jóvenes sanos estaban dentro de los rangos de normalidad. Las principales características antropométricas de los ancianos sanos se exponen en la Tabla IV.

Los datos de los pacientes con diabetes mellitus no insulín-dependiente se recogen en la Tabla V. Todos los pacientes pertenecientes a este grupo, presentaban un **índice de masa corporal (IMC)** por encima del rango de normalidad (22,7-25 para varones y 22,4-24,5 para mujeres). Todos los varones y solamente una mujer presentaban un peso superior al 20% del peso ideal (sobrepeso 20% del peso ideal: varón >27,2 y mujer >26,9).

Los pacientes diabéticos presentaban un **índice de cintura cadera (ICC)** superior a los valores normales (varón <0,95 y mujer <0,80).

Los varones diabéticos presentaban el **pliegue cutáneo tricípital (PCT)** superior al valor considerado normal (rango PCT en varones: 11-22 cm). En

el grupo de mujeres diabéticas, solamente en dos de ellas, se encontraron valores elevados (rango PCT en mujeres: 18-36 cm).

Respecto a la **circunferencia media del brazo (CMB)**, todos los pacientes diabéticos estaban dentro del rango de normalidad (22-31 cm para varones y 19-28 cm para mujeres).

4.1.3. DATOS ANALITICOS

El estudio bioquímico de los pacientes diabéticos mostró que todos ellos cumplían los criterios establecidos por la OMS para el diagnóstico de la DMNID, cuantificándose una glucemia basal en ayunas comprendida entre 9 y 12 mmol/L. Por otra parte los niveles de insulinemia oscilaban entre 190 y 230 pmol/L.

Para comprobar el estado nutricional de los pacientes diabéticos y ancianos sanos se determinaron los siguientes parámetros: albúmina, transferrina y cinc, estando todos ellos dentro de límites normales.

Por otra parte, los datos hematológicos correspondientes al recuento de leucocitos y linfocitos también estaba dentro del rango de normalidad (Tablas VI y VII).

4.2. NIVELES BASALES DE CITOQUINAS Y TRAS UN PERIODO DE INCUBACION DE 30 MINUTOS

4.2.1. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-1 β

El análisis de las concentraciones basales de la IL-1 β en los tres grupos de sujetos estudiados, reveló diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de adultos jóvenes y ancianos sanos, siendo los valores más elevados en el primer grupo ($8,2 \pm 2,3$ pg/mL vs $5,8 \pm 1,1$ pg/mL, $p < 0,05$).

La cuantificación de la IL-1 β en las muestras incubadas en condiciones control, es decir aquellas incubadas en atmósfera con 5% de CO₂ durante 4 horas y a 37 °C, revelaron valores prácticamente iguales entre los tres grupos de pacientes (Tabla VIII). El incremento experimentado por la IL-1 β tras el período de incubación en el conjunto global de individuos, mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a las alícuotas consideradas basales ($p < 0,05$ para cada grupo estudiado; figura 2), lo que significa que las condiciones del experimento eran adecuadas para proceder a las sucesivas estimulaciones.

4.2.2. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-6

Los valores de IL-6 en las muestras basales fueron similares en los tres grupos a estudio, aunque ligeramente más elevados en los ancianos sanos ($4,9 \pm 1,3$ pg/mL).

Los niveles de IL-6 alcanzados en las alícuotas correspondientes a las incubaciones en condiciones control fueron similares para toda la población estudiada (Tabla VIII), y el incremento sufrido por la citoquina también mostró

diferencias estadísticamente significativas en los tres grupos de pacientes con respecto a las alícuotas consideradas basales ($p < 0,05$; figura 2).

4.2.3. PRODUCCION DE TNF-alfa

Los niveles basales de TNF-alfa resultaron ser más elevados en los ancianos sanos que en los otros grupos de sujetos. El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas cuando comparáramos este grupo con los adultos jóvenes sanos ($31,0 \pm 13,9$ pg/mL vs $9,3 \pm 6,2$ pg/mL; $p < 0,05$) y con los pacientes diabéticos ($31,0 \pm 13,9$ pg/mL vs $7,3 \pm 1,8$ pg/mL; $p < 0,05$).

Respecto a la producción espontánea de TNF-alfa tras incubación durante 4 horas (muestras control), el incremento sufrido por esta citoquina fue similar en todos los grupos (Tabla VIII), mostrando también significación estadística ($p < 0,05$; figura 2), respecto a las muestras basales.

4.3. RESPUESTA DE LAS CITOQUINAS AL ESTIMULO CON LPS

4.3.1. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-1 β

La producción de IL-1 β experimentó un gran incremento tras el estímulo con LPS.

Comparando el aumento experimentado tras el estímulo con LPS y las muestras incubadas en condiciones control existían diferencias estadísticamente significativas en los tres grupos de pacientes ($p < 0,001$; figura 3).

El incremento más acentuado lo experimentaron los ancianos sanos, observándose significación estadística entre el grupo de adultos jóvenes y ancianos sanos (1711 ± 786 pg/mL vs 2490 ± 905 pg/mL, $p < 0,05$), así como entre los ancianos sanos y diabéticos (2490 ± 905 pg/mL vs 1154 ± 451 pg/mL, $p < 0,05$) (Tabla IX).

4.3.2. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-6

Respecto a las muestras incubadas en condiciones control, el incremento experimentado con el LPS mostró también diferencias estadísticamente significativas en los tres grupos ($p < 0,001$; figura 3).

La producción de IL-6 fue similar en los tres grupos, aunque ligeramente superior en los adultos jóvenes sanos (711 ± 268 pg/mL; Tabla X).

4.3.3. PRODUCCION DE TNF-alfa

Estableciendo una comparación con el grupo de muestras incubadas en condiciones control, existían diferencias estadísticamente significativas en

los tres grupos estudiados ($p < 0,001$; figura 3).

La estimulación con LPS originó una gran elevación de TNF-alfa en la población estudiada, siendo sus niveles similares en los tres grupos, aunque más elevados en los adultos jóvenes (4576 ± 1666 pg/mL; Tabla XI).

4.4. PRODUCCION DE CITOQUINAS TRAS EL ESTIMULO CON NEUROPEPTIDOS

4.4.1. RESPUESTA AL NEUROPEPTIDO Y

4.4.1.1. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-1 β

La producción de IL-1 β tras el estímulo con neuropéptido Y a concentraciones consideradas fisiológicas (10⁻⁹M) se incrementó en los tres grupos estudiados, siendo este aumento mayor en el grupo de ancianos sanos (188 \pm 71 pg/mL).

Estableciendo una comparación entre la estimulación originada por el NPY y las muestras incubadas en condiciones control en los tres grupos estudiados, observamos que entre el incremento causado por el NPY sobre la IL-1 β y los valores correspondientes a las muestras incubadas en condiciones control existían diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; figura 4).

Comparando la producción IL-1 β entre los tres grupos, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los ancianos sanos y los ancianos diabéticos (188 \pm 71 pg/mL vs 168 \pm 36 pg/mL; $p < 0,05$) (Tabla IX).

4.4.1.2. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-6

Respecto a la muestras incubadas en condiciones control, la estimulación inducida por el NPY también presentó significación estadística en el grupo de adultos jóvenes ($p < 0,05$; figura 8).

La síntesis de IL-6 después de la estimulación con NPY a concentraciones fisiológicas se potenció solamente en el grupo de adultos

jóvenes (307 ± 109 pg/mL) y se inhibió ligeramente en los ancianos sanos (169 ± 68 pg/mL) observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p < 0,05$, Tabla X).

4.4.1.3. PRODUCCION DE TNF-alfa

El NPY potenció la producción de TNF-alfa en los tres grupos del estudio con respecto a las muestras incubadas en condiciones control, existiendo diferencias estadísticamente significativas en los tres grupos en relación a ellas ($p < 0,01$; figura 12).

Los niveles de TNF-alfa tras el estímulo con NPY fueron similares en los tres grupos del estudio, aunque ligeramente más elevados en los pacientes diabéticos (Tabla XI).

4.4.2. RESPUESTA A LA SOMATOSTATINA

4.4.2.1. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-1 β

Comparando las concentraciones de IL-1 β tras el estímulo con somatostatina con los niveles presentados por las muestras incubadas en condiciones control, en la elevación presentada por los adultos jóvenes y los ancianos sanos encontramos significación estadística ($p < 0,05$ para ambos grupos; figura 5).

Los niveles de IL-1 β tras la estimulación con somatostatina a concentraciones fisiológicas fueron similares en los grupos de individuos sanos y ligeramente más bajos en los pacientes diabéticos. No observamos diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (Tabla IX).

4.4.2.2. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-6

Los valores de IL-6 tras la estimulación con somatostatina fueron similares en los tres grupos de población estudiada, aunque algo más elevados en los pacientes diabéticos (267 ± 78 pg/mL) (Tabla X).

Estableciendo una comparación entre los niveles de las muestras incubadas en condiciones control y tras el estímulo con somatostatina, observamos que los grupos de ancianos sanos y diabéticos presentan un pequeño incremento en la producción de IL-6, aunque sin significación estadística (Figura 9).

4.4.2.3. PRODUCCION DE TNF-alfa

Respecto a las muestras incubadas en condiciones control, todos los grupos experimentaron un incremento del TNF-alfa con una significación estadística para cada grupo de $p < 0,01$ (Figura 13).

La concentración de TNF-alfa tras la estimulación inducida por la somatostatina fue similar en todos los grupos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas. Los valores más altos los presentaron los pacientes diabéticos (1300 ± 458 pg/mL; tabla XI).

4.4.3. RESPUESTA AL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO

4.4.3.1. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-1 β

El estímulo inducido por el VIP respecto a las muestras incubadas en condiciones control potenció la síntesis de IL-1 β en los grupos de población sana (88 ± 44 pg/mL vs 345 ± 142 pg/mL, $p < 0,001$ en los adultos jóvenes y 82 ± 51 pg/mL vs 308 ± 75 pg/mL, $p < 0,001$ en los ancianos sanos). En los pacientes diabéticos la producción de IL-1 β prácticamente no sufrió

variaciones (Figura 6).

Las concentraciones de IL-1 β tras el estímulo con VIP a concentraciones fisiológicas (10 \cdot M) en los tres grupos de pacientes se reflejan en la Tabla IX. Se obtuvieron valores significativamente más bajos en los pacientes diabéticos respecto a los ancianos sanos (133 \pm 58 pg/mL vs 308 \pm 75 pg/mL, $p<0,05$) y a los adultos jóvenes (133 \pm 58 pg/mL vs 345 \pm 142 pg/mL, $p<0,05$).

4.4.3.2. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-6

La figura 10 refleja el incremento de la síntesis de IL-6 experimentado por cada grupo de individuos respecto a las muestras incubadas en condiciones control. La mayor estimulación fue experimentada por las muestras pertenecientes al grupo de pacientes diabéticos (196 \pm 143 pg/mL vs 1161 \pm 74 pg/mL, $p<0,001$), seguido de los ancianos sanos (193 \pm 113 pg/mL vs 498 \pm 133 pg/mL, $p<0,01$) y de los adultos jóvenes (198 \pm 107 pg/mL vs 379 \pm 102 pg/mL, $p<0,01$).

Las concentraciones obtenidas de IL-6 después del estímulo con VIP se expresan en la Tabla X. Los ancianos diabéticos mostraron los valores más elevados de IL-6 (1161 \pm 74 pg/mL), seguidos de los ancianos sanos (498 \pm 133 pg/mL). Existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de adultos jóvenes y ancianos sanos ($p<0,05$), adultos jóvenes y ancianos diabéticos ($p<0,05$) y ancianos sanos y ancianos diabéticos ($p<0,05$).

4.4.3.3. PRODUCCION DE TNF-alfa

Estableciendo una comparación entre las muestras incubadas en condiciones control y las estimuladas con VIP, observamos que los grupos de

población sana experimentan un aumento en la producción de TNF-alfa, aunque solamente existe significación estadística en los ancianos sanos (512 ± 265 pg/mL vs 954 ± 215 pg/mL, $p < 0,01$), mientras que en los ancianos diabéticos prácticamente no se modifica (Figura 14).

Los niveles de TNF-alfa tras la estimulación con VIP quedan reflejadas en la Tabla XI. Los valores más altos de TNF-alfa se obtuvieron en los ancianos sanos (954 ± 215 pg/mL) seguidos de los adultos jóvenes (723 ± 209 pg/mL) y ancianos diabéticos (674 ± 188 pg/mL). Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de población sana ($p < 0,05$) y entre los ancianos sanos y ancianos diabéticos ($p < 0,05$).

4.4.4. RESPUESTA AL PEPTIDO LIBERADOR DE GASTRINA

4.4.4.1. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-1 β

La producción de IL-1 β respecto a las muestras incubadas en condiciones control experimentó un ascenso estadísticamente significativo en los ancianos sanos y en los ancianos diabéticos ($p < 0,01$), permaneciendo invariable en los adultos jóvenes (Figura 7).

Las concentraciones de IL-1 β en los tres grupos estudiados, después de la estimulación con GRP a concentraciones fisiológicas (10^{-10} M), se exponen en la Tabla IX. Los ancianos sanos mostraron los niveles más altos y los adultos jóvenes los más bajos; encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los adultos jóvenes y ancianos sanos (87 ± 25 pg/mL vs 407 ± 25 pg/mL, $p < 0,001$) y adultos jóvenes y pacientes ancianos diabéticos (87 ± 25 pg/mL vs 303 ± 10 pg/mL, $p < 0,05$).

4.4.4.2. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-6

La producción de IL-6 experimentó un gran ascenso respecto a las muestras incubadas en condiciones control en los ancianos sanos y diabéticos mostrando una significación estadística para cada grupo de $p < 0,001$. En los adultos jóvenes, el aumento en la producción de esta citoquina no fue tan marcado ($p < 0,05$) (Figura 11).

Los niveles de IL-6 tras el estímulo con GRP se expresan en la Tabla X. Los ancianos sanos presentaron los valores más elevados (1766 ± 121 pg/mL), seguidos de los ancianos diabéticos (1246 ± 168 pg/mL) y adultos jóvenes (313 ± 58 pg/mL). Observamos diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de población sana ($p < 0,001$), entre los adultos jóvenes y ancianos diabéticos ($p < 0,001$) y entre los ancianos sanos y diabéticos ($p < 0,05$).

4.4.4.3. PRODUCCION DE TNF-alfa

El efecto del GRP varió según el grupo de pacientes (Figura 15). No ejerció ningún efecto sobre la producción de TNF-alfa en los ancianos sanos, como se comprueba al comparar estos valores con los de las muestras incubadas en condiciones control e inhibió la síntesis de la citoquina en los adultos jóvenes ($p < 0,001$). Sin embargo, en los ancianos diabéticos el TNF-alfa experimentó un incremento (722 ± 205 pg/mL vs 1090 ± 77 pg/mL, $p < 0,01$).

Los niveles de TNF-alfa después de estimular con GRP en los tres grupos se expresan en la Tabla XI. Los ancianos diabéticos mostraron los valores más elevados (1090 ± 77 pg/mL), seguidos de los ancianos sanos (691 ± 46 pg/mL) y adultos jóvenes (116 ± 31 pg/mL). Comparando los tres grupos entre sí, observamos diferencias estadísticamente significativas entre

los adultos jóvenes y ancianos sanos ($p < 0,001$), adultos jóvenes y ancianos diabéticos ($p < 0,001$) así como entre los ancianos sanos y ancianos diabéticos ($p < 0,01$).

4.5. SINTESIS DE CITOQUINAS EN RESPUESTA AL ESTIMULO COMBINADO DE NEUROPEPTIDOS Y LIPOPOLISACARIDO (LPS)

Para investigar si los neuropéptidos NPY, somatostatina, VIP y GRP podían ejercer alguna influencia, bien aumentando o disminuyendo, sobre la producción de citoquinas inducida por el LPS incubamos las muestras con LPS a una concentración de 25 µg/mL y cada neuropéptido a una concentración de 10^{-10} M para el NPY, somatostatina y GRP y de 10^{-9} M para el VIP.

4.5.1. RESPUESTA AL NPY COMBINADO CON LPS

Los resultados obtenidos tras estimular las células de sangre total con NPY a una concentración 10^{-10} M y LPS a una concentración de 25 µg/mL, sobre la síntesis de IL-1β, IL-6 y TNF-alfa se exponen en las Tablas XII, XIII y XIV.

4.5.1.1. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-1β

Los resultados obtenidos en la producción de IL-1β en respuesta al estímulo combinado de NPY y LPS se muestran en la Tabla XII. Los valores de los adultos jóvenes y los ancianos sanos fueron similares, mientras que los ancianos diabéticos exhibían unas concentraciones más bajas, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre este grupo y los adultos jóvenes (2457 ± 940 pg/mL vs 1363 ± 614 pg/mL, $p < 0,05$).

Por otra parte, el NPY causó un incremento significativo de la producción de IL-1β en las células estimuladas con LPS procedentes de

adultos jóvenes (1711 ± 786 pg/mL vs 2547 ± 940 pg/mL, $p < 0,01$), lo que sugiere un efecto aditivo del NPY y el LPS sobre la producción de IL-1 β . En los ancianos sanos y ancianos diabéticos este efecto no se observó, permaneciendo invariable la síntesis de la citoquina (Figura 4).

4.5.1.2. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-6

Las concentraciones de IL-6 tras estimular las células de sangre total con LPS, NPY y ambos, se reflejan en la Tabla XIII. Cuando estimulamos con NPY y LPS, los niveles más elevados se obtuvieron en los adultos jóvenes, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre este grupo y ancianos sanos (720 ± 289 pg/mL vs 406 ± 163 pg/mL, $p < 0,05$) y ancianos diabéticos (720 ± 289 pg/mL vs 256 ± 103 pg/mL, $p < 0,05$), y ancianos sanos y ancianos diabéticos (406 ± 163 pg/mL vs 256 ± 103 pg/mL, $p < 0,05$).

El NPY modificó la respuesta celular al LPS, en el sentido de inhibir ligeramente la producción de IL-6, en el grupo de pacientes diabéticos (476 ± 151 pg/mL vs 256 ± 103 pg/mL, $p < 0,05$). Sin embargo en la población sana el NPY, a concentraciones fisiológicas (10^{-10} M), no influyó en la respuesta de las células de sangre total a la estimulación ejercida por el LPS (Figura 8).

4.5.1.3. PRODUCCION DE TNF-alfa

Los resultados se muestran en la Tabla XIV y reflejan la similitud de datos entre los tres grupos estudiados. La acción estimuladora que el NPY ejerce sobre la producción de TNF-alfa es de menor cuantía que la ejercida por el activador policlonal LPS. Por otra parte, el NPY no influye en la respuesta estimuladora celular inducida por el LPS (Figura 12).

4.5.2. RESPUESTA A LA SOMATOSTATINA COMBINADA CON LPS

En las Tablas XII, XIII y XIV se exponen las concentraciones de IL-1 β , IL-6 y TNF-alfa después de incubar las muestras con LPS (25 μ g/mL) y somatostatina (10^{-10} M).

4.5.2.1. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-1 β

La concentración de IL-1 β tras estimular las células de sangre total con LPS, somatostatina, así como con LPS y somatostatina, se exponen en la Tabla XII. Sólomente encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de adultos jóvenes y ancianos diabéticos cuando estimulamos simultáneamente con el activador policlonal y el neuropéptido (2109 ± 804 pg/mL vs 1219 ± 478 pg/mL, $p < 0,05$). La acción de LPS sobre la producción de IL-1 β no parece modificarse por la somatostatina en ninguno de los tres grupos, permaneciendo prácticamente iguales sus niveles (Figura 5).

4.5.2.2. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-6

En la Tabla XIII se muestran los niveles de IL-6 tras estimular las muestras con LPS, somatostatina y LPS y somatostatina. Los adultos jóvenes responden al estímulo combinado de somatostatina y LPS con una síntesis de IL-6 ligeramente superior a la de los otros grupos, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de adultos jóvenes y ancianos sanos (761 ± 298 pg/mL vs 568 ± 172 pg/mL, $p < 0,05$) y adultos jóvenes y ancianos diabéticos (761 ± 298 pg/mL vs 478 ± 138 pg/mL, $p < 0,05$)

Al estimular conjuntamente con LPS y somatostatina, no se observan cambios en ninguno de los tres grupos en los niveles de IL-6 respecto a

cuando estimulamos solamente con LPS, lo cual nos hace suponer que la somatostatina no ejercería ninguna influencia sobre la síntesis de IL-6 inducida por el LPS (Figura 9).

4.5.2.3. PRODUCCION DE TNF-alfa

Los niveles de TNF-alfa se recogen en la Tabla XIV. La estimulación con LPS y somatostatina indujo una síntesis de TNF-alfa similar en los tres grupos estudiados, siendo ligeramente superior en los adultos jóvenes (4280 ± 1640 pg/mL). Con este estímulo combinado no se produjeron variaciones respecto al estímulo realizado exclusivamente con LPS en ninguno de los tres grupos (Figura 13), no ejerciendo la somatostatina efecto alguno sobre la síntesis de TNF-alfa inducida por el LPS.

4.5.3. RESPUESTA AL VIP COMBINADO CON LPS

Los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF-alfa (pg/mL) tras estimular las células de sangre total con VIP a una concentración de 10^{-9} M y LPS a una concentración de 25 μ g/mL se exponen en las Tablas XII, XIII, y XIV.

4.5.3.1. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-1 β

Las concentraciones de IL-1 β tras el estímulo del LPS, VIP y LPS más VIP se muestran en la Tabla XII. La estimulación combinada de LPS y VIP mostró que los adultos jóvenes presentaban valores más altos y los ancianos diabéticos más bajos. Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los adultos jóvenes y ancianos diabéticos (2153 ± 905 pg/mL vs 1146 ± 211 pg/mL, $p < 0,05$) y ancianos sanos y diabéticos (1831 ± 371 pg/mL vs 1146 ± 211 pg/mL, $p < 0,05$).

Por otra parte al comparar la acción del LPS y la ejercida por el LPS y VIP simultáneamente, no parece existir ninguna influencia del neuropéptido sobre la acción del mitógeno, ya que las concentraciones de la citoquina prácticamente no sufren ninguna variación en cualquiera de los tres grupos (Figura 6).

4.5.3.2. PRODUCCIÓN DE INTERLEUQUINA-6

El efecto del estímulo combinado de LPS y VIP fue variable dependiendo del grupo analizado (Tabla XIII). En los tres grupos la producción de la citoquina aumentó considerablemente, siendo los valores más elevados en los ancianos sanos. Existían diferencias estadísticamente significativas entre los adultos jóvenes y ancianos sanos (2756 ± 658 pg/mL vs 9198 ± 1163 pg/mL, $p < 0,001$), adultos jóvenes y ancianos diabéticos (2756 ± 658 pg/mL vs 1716 ± 365 pg/mL, $p < 0,05$), y entre los ancianos sanos y diabéticos (9198 ± 1163 pg/mL vs 1716 ± 365 pg/mL, $p < 0,001$).

Cuando comparamos la acción del LPS y la ejercida por el LPS y el VIP, observamos el aumento estadísticamente significativo de la producción de la IL-6 en todos los grupos, siendo este incremento muy llamativo en el grupo de los ancianos sanos (598 ± 241 pg/mL vs 9198 ± 1163 pg/mL, $p < 0,001$; figura 10).

4.5.3.3. PRODUCCION DE TNF-alfa

Los resultados tras la estimulación celular con LPS, VIP y LPS más VIP se exponen en la Tabla XIV, siendo similares en los tres grupos aunque algo más altos en los ancianos sanos (3747 ± 1539 pg/mL). Por otra parte, al comparar la acción del LPS y la del LPS y VIP, observamos que el neuropéptido inhibe significativamente la acción del activador policlonal en los

adultos jóvenes ($p < 0,001$), no ejerciendo ninguna influencia en la producción de TNF-alfa en los otros dos grupos (Figura 14).

4.5.4. RESPUESTA AL GRP COMBINADO CON LPS

Las concentraciones de IL-1 β , IL-6 y TNF-alfa tras estimular las células de sangre total con LPS a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ y con GRP a una concentración de 10^{-10}M se resumen en las Tablas XII, XIII y XIV.

4.5.4.1. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-1 β

El estímulo combinado de LPS y GRP estimuló la producción de IL-1 β en los tres grupos siendo los valores más elevados en los ancianos sanos. Observamos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de adultos jóvenes y ancianos sanos (1810 ± 152 pg/mL vs 3084 ± 283 pg/mL, $p < 0,001$) y ancianos sanos y diabéticos (3084 ± 283 pg/mL vs 1984 ± 211 pg/mL, $p < 0,001$) (Tabla XII).

El GRP no modificó la producción de la IL-1 β inducida por el LPS, de forma significativa, en ninguno de los tres grupos estudiados. Sin embargo, como se observa en la figura 7, parece existir un pequeño efecto aditivo estimulador de la producción de IL-1 β entre el neuropéptido y el mitógeno, ya que la síntesis de la citoquina se eleva ligeramente en los tres grupos, respecto al LPS sólo.

4.5.4.2. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA-6

La acción simultánea del LPS y el GRP (Tabla XIII) causó una gran elevación en la producción de IL-6, especialmente en la población anciana. Las concentraciones más altas las presentaron los ancianos sanos (4876 ± 765 pg/mL), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre este grupo

y los adultos jóvenes (943 ± 121 pg/mL, $p < 0,001$) y entre los ancianos diabéticos y los adultos jóvenes (4133 ± 684 pg/mL vs 943 ± 121 pg/mL, $p < 0,001$).

Como se refleja en la figura 11 y en la Tabla XIII, entre el GRP y el LPS parece existir un efecto sinérgico para estimular la síntesis de IL-6, ya que el neuropéptido potencia la acción del mitógeno tanto en los ancianos sanos (LPS= 597 ± 240 pg/mL vs LPS+GRP= 4876 ± 765 pg/mL, $p < 0,001$) como en los diabéticos (LPS= 476 ± 152 pg/mL vs 4133 ± 684 pg/mL, $p < 0,001$). Este efecto no se observa en los adultos jóvenes, en los que el neuropéptido no modifica la producción inducida por el activador policlonal, aunque parece existir un ligero efecto aditivo entre ambos (LPS= 711 ± 268 pg/mL vs LPS+GRP= 943 ± 121 , NS).

4.5.4.3. PRODUCCION DE TNF-alfa

Los resultados después de estimular las células con LPS, GRP y LPS+GRP se reflejan en la Tabla XIV. Observamos que los adultos jóvenes presentan una síntesis de TNF-alfa inferior a la población anciana, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los adultos jóvenes y ancianos sanos (1113 ± 165 pg/mL vs 3494 ± 611 pg/mL, $p < 0,001$) y los ancianos diabéticos (1113 ± 165 pg/mL vs 4369 ± 316 pg/mL, $p < 0,001$), así como entre los ancianos sanos y diabéticos (3494 ± 611 pg/mL vs 4369 ± 316 pg/mL, $p < 0,01$).

En la figura 15, observamos que en el grupo de adultos jóvenes el GRP frena la acción del LPS de forma significativa, por lo que la producción de TNF-alfa sufre un llamativo descenso (LPS= 4576 ± 1666 pg/mL vs LPS+GRP= 1113 ± 165 pg/mL, $p < 0,001$). En los grupos de población anciana, el neuropéptido estimula la síntesis de TNF-alfa inducida por el LPS en los

diabéticos (LPS= 2964 ± 1651 pg/mL vs LPS+GRP= 4369 ± 316 pg/mL, $p < 0,01$), mientras que en el grupo de ancianos sanos no sufre modificaciones (LPS= 3792 ± 1136 pg/mL vs 3494 ± 611 pg/mL, NS).

Las Tablas XV, XVI y XVII muestran los resultados globales del estudio de citoquinas: la producción basal y tras cuatro horas de incubación a 37°C (controles) de IL- 1β , IL-6 y TNF-alfa, así como los valores obtenidos después de la estimulación con LPS y/o neuropéptidos (NPY, somatostatina, VIP y GRP).

4.6. PRODUCCION DE LEUCOTRIENO B4

4.6.1. NIVELES BASALES Y TRAS UN PERIODO DE INCUBACION DE 30 MINUTOS

En la Tabla XVIII se muestran las concentraciones de LB4 basales y tras un período de incubación de 30 minutos. Este tiempo de incubación creemos que es suficiente para que la síntesis del mediador inflamatorio tenga lugar tras la estimulación de diversos neuropéptidos, como se explicará posteriormente.

Los niveles basales de LB4 fueron significativamente más bajos en el grupo de adultos jóvenes respecto a ancianos sanos ($8,2 \pm 1,1$ ng/mL vs $12,4 \pm 1,4$ ng/mL, $p < 0,05$) y ancianos diabéticos ($8,2 \pm 1,1$ ng/mL vs $12,5 \pm 1,6$ ng/mL, $p < 0,05$). Tras incubar las muestras de sangre 30 minutos, la síntesis de LB4 disminuyó en los tres grupos, observándose diferencias estadísticamente significativas entre los adultos jóvenes y los ancianos diabéticos ($6,2 \pm 1,2$ ng/mL vs $9,4 \pm 0,5$ ng/mL, $p < 0,05$). Esta disminución de los niveles de LB4 tras 30 minutos de incubación, fue significativa en todos los grupos (Figura 16).

4.6.2. RESPUESTA AL ESTIMULO CON LPS

La estimulación con el activador policlonal y tras un período de incubación de 30 minutos (Tabla XVIII) potenció la síntesis de LB4 en todos los grupos. Los niveles más elevados se detectaron en los ancianos diabéticos y los más bajos en los adultos jóvenes. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los adultos jóvenes y ancianos diabéticos ($25,9 \pm 4,4$ ng/mL vs $41,0 \pm 6,6$ ng/mL, $p < 0,01$) y ancianos sanos y diabéticos ($30,5 \pm 2,5$ ng/mL vs $41,0 \pm 6,6$ ng/mL, $p < 0,01$). Con respecto a sus muestras

incubadas en condiciones control, en todos los grupos el incremento de la síntesis de LB4 fue estadísticamente significativo (Figura 16).

4.6.3. RESPUESTA AL ESTIMULO CON NEUROPEPTIDOS

En la Tabla XVIII se exponen los resultados tras el estímulo con NPY (10^{-10} M), somatostatina (10^{-10} M), VIP (10^{-9} M) y GRP (10^{-10} M). En las Figuras 17, 18, 19 y 20 se destaca la estimulación producida por estos neuropéptidos.

La estimulación con **NPY** (Tabla XVIII y Figura 17) no causó modificaciones en los niveles de LB4, no apreciándose diferencias significativas entre los tres grupos ni cuando comparamos estos valores con los valores de las muestras incubadas en condiciones control.

La estimulación con **somatostatina** (Figura 18) originó una disminución de la síntesis de LB4 en todos los individuos, siendo esta disminución más acusada en los ancianos sanos ($7,1 \pm 2,3$ ng/mL vs $3,7 \pm 2,3$ ng/mL, $p < 0,01$). Comparando los tres grupos entre sí (Tabla XVIII), observamos diferencias estadísticamente significativas entre los adultos jóvenes y ancianos diabéticos ($4,1 \pm 1,5$ ng/mL vs $7,8 \pm 2,2$ ng/mL, $p < 0,05$) y entre ancianos sanos y diabéticos ($3,7 \pm 1,6$ vs $7,8 \pm 2,2$ ng/mL, $p < 0,05$).

El **VIP** tampoco modificó de forma apreciable la síntesis de LB4, aunque en la población sana causó una ligera disminución (Figura 19). Esta disminución fue estadísticamente significativa si comparamos (Tabla XVIII) los adultos jóvenes y los ancianos diabéticos ($4,8 \pm 1,6$ ng/mL vs $9,3 \pm 0,7$ ng/mL, $p < 0,05$) y los ancianos sanos y diabéticos ($5,3 \pm 0,6$ ng/mL vs $9,3 \pm 0,7$ ng/mL, $p < 0,05$).

Con respecto al **GRP**, su estímulo tampoco aumentó o disminuyó la producción de LB4 aunque, al igual que los otros neuropéptidos, en la población sana sus niveles descendieron ligeramente respecto a las muestras

incubadas en condiciones control (Figura 20). Por otra parte, analizando los tres grupos (Tabla XVIII) encontramos que entre los adultos jóvenes y ancianos diabéticos existía significación estadística ($5,1 \pm 2,6$ ng/mL vs $9,8 \pm 0,5$ ng/mL, $p < 0,05$).

4.7. PRODUCCION DE NEOPTERINA

4.7.1. NIVELES BASALES Y TRAS UN PERIODO DE INCUBACION DE 30 MINUTOS

En la Tabla XIX se muestran las concentraciones basales de neopterina y tras un período de incubación de 30 minutos. Este tiempo de incubación creemos que es suficiente para que la síntesis del mediador inflamatorio tenga lugar tras la estimulación de LPS y diversos neuropéptidos.

Los niveles basales de neopterina fueron significativamente más bajos en el grupo de adultos jóvenes respecto a los ancianos diabéticos ($1,0 \pm 0,2$ ng/mL vs $3,2 \pm 0,6$ ng/mL, $p < 0,05$). Tras incubar las muestras de sangre 30 minutos, los niveles de neopterina disminuyeron en los tres grupos, observándose diferencias estadísticamente significativas entre los adultos jóvenes y los ancianos diabéticos ($0,8 \pm 0,3$ ng/mL vs $1,8 \pm 0,4$ ng/mL, $p < 0,05$). Esta disminución de los niveles de neopterina tras 30 minutos de incubación, fue prácticamente inapreciable en los tres grupos (Figura 21).

4.7.2. RESPUESTA AL ESTIMULO CON LPS

La estimulación con el activador policlonal y tras un período de incubación de 30 minutos (Tabla XIX) no causó efecto alguno en la síntesis de neopterina. Los niveles más elevados se detectaron en los ancianos diabéticos y los más bajos en los adultos jóvenes. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los adultos jóvenes y ancianos diabéticos ($0,5 \pm 0,2$ ng/mL vs $2,1 \pm 0,3$ ng/mL, $p < 0,05$). Con respecto a sus muestras incubadas en condiciones control, en los grupos de población sana se produjo una ligera disminución de la síntesis de neopterina y en los ancianos diabéticos un pequeño incremento (Figura 21).

4.7.3. RESPUESTA AL ESTIMULO CON NEUROPEPTIDOS

En la Tabla XIX se exponen los resultados tras el estímulo con NPY (10^{-10} M), somatostatina (10^{-10} M), VIP (10^{-9} M) y GRP (10^{-10} M). En las Figuras 22, 23, 24 y 25 se refleja la estimulación producida por estos neuropéptidos.

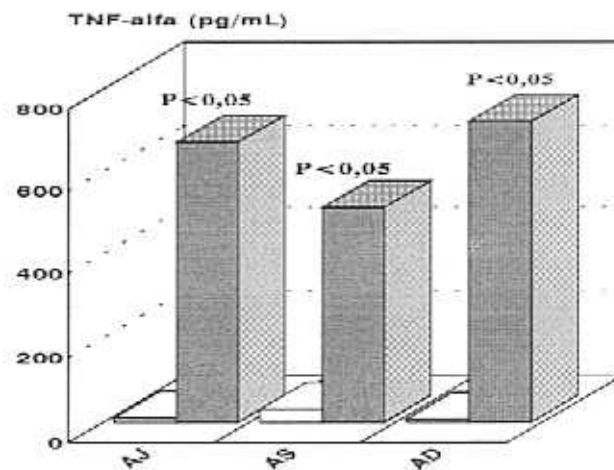
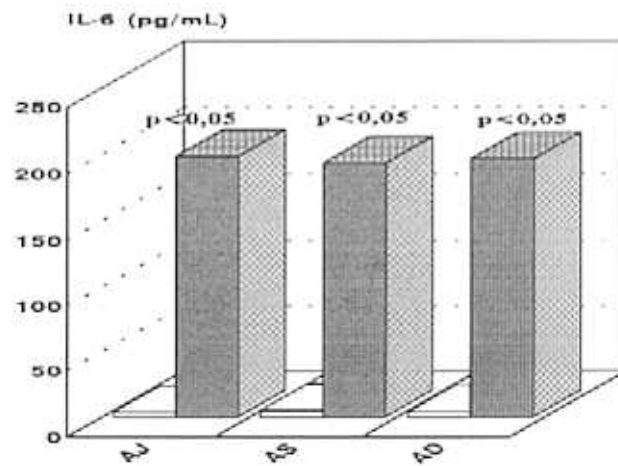
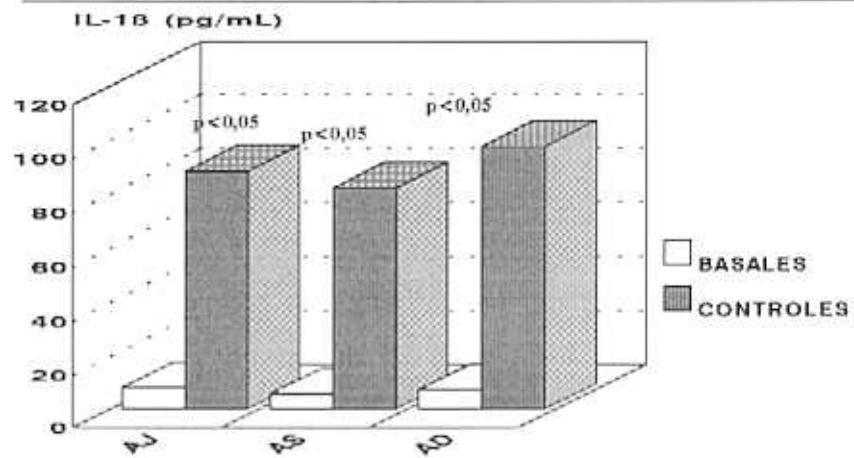
La estimulación con **NPY** (Figura 22) provocó un ascenso de las concentraciones de neopterina respecto a las concentraciones de muestras incubadas en condiciones control en los ancianos sanos ($1,4 \pm 0,2$ ng/mL vs $2,2 \pm$ ng/mL, $p < 0,05$) y en los diabéticos ($1,8 \pm 0,4$ ng/mL vs $3,9 \pm 0,4$ ng/mL, $p < 0,01$) y no causó modificaciones en los adultos jóvenes. Apreciamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de neopterina (Tabla XIX) entre los adultos jóvenes y los ancianos diabéticos ($p < 0,001$) y los ancianos sanos y diabéticos ($p < 0,01$).

La estimulación con **somatostatina** (Figura 23) originó un incremento de la síntesis de neopterina en todos los individuos con respecto a las muestras incubadas en condiciones control, siendo este ascenso más acusado en los adultos jóvenes ($0,8 \pm 0,3$ ng/mL vs $7,8 \pm 1,7$ ng/mL, $p < 0,001$) y en los ancianos sanos ($1,4 \pm 0,2$ ng/mL vs $6,5 \pm 1,4$ ng/mL, $p < 0,001$). Comparando los tres grupos entre sí (Tabla XIX), observamos diferencias estadísticamente significativas entre los adultos jóvenes y ancianos diabéticos ($p < 0,001$) y entre ancianos sanos y diabéticos ($p < 0,001$).

El **VIP** no modificó de forma apreciable la síntesis de neopterina (Figura 24). Comparando los niveles entre los tres grupos (Tabla XIX), observamos diferencias estadísticamente significativas entre los adultos jóvenes y ancianos diabéticos ($0,7 \pm 0,2$ ng/mL vs $1,2 \pm 0,3$ ng/mL, $p < 0,05$).

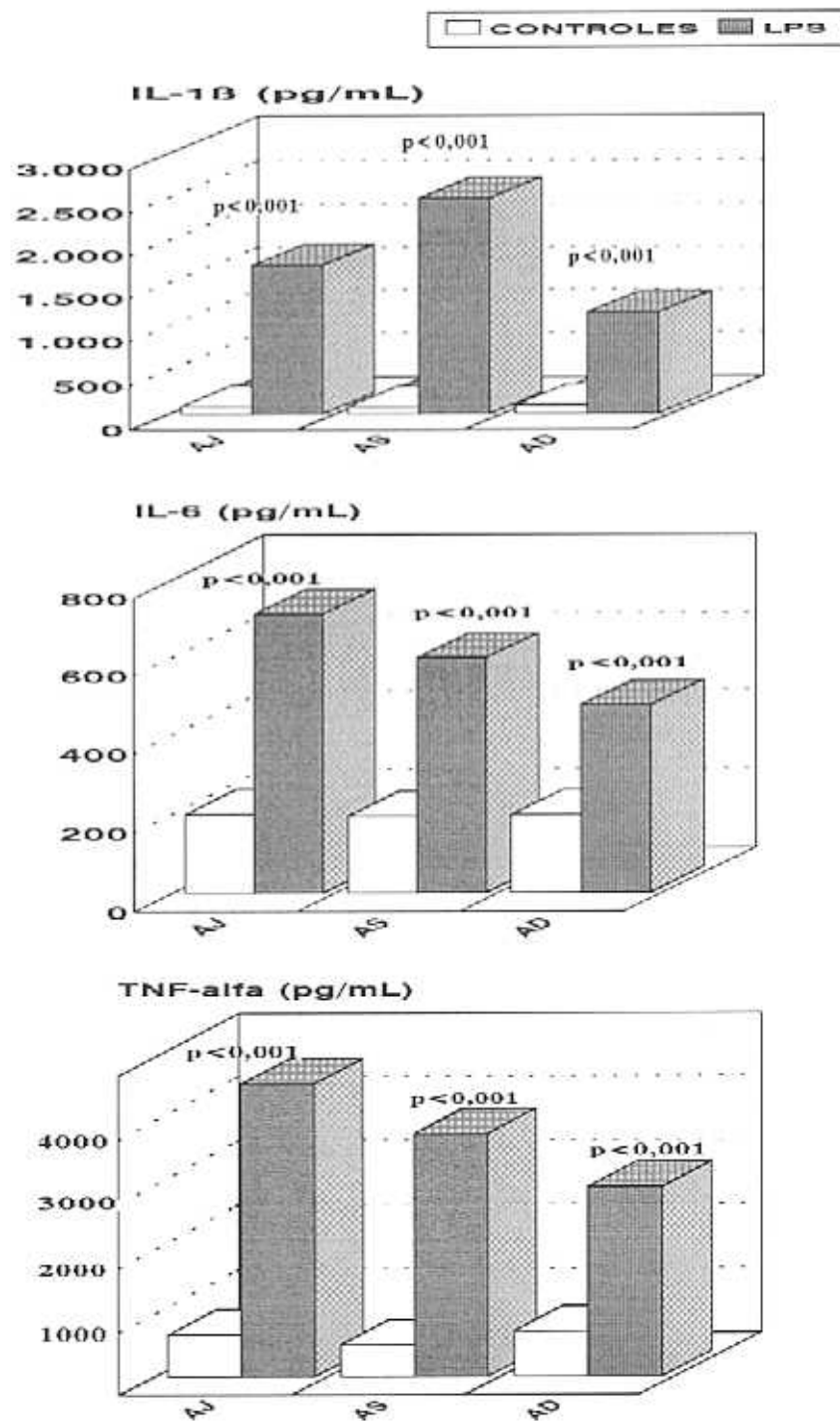
Con respecto al **GRP** (Figura 25), su estímulo causó un aumento en la producción de neopterina respecto a su muestra incubada en condiciones control en los adultos jóvenes ($0,8 \pm 0,3$ ng/mL vs $1,4 \pm 0,3$ ng/mL, $p < 0,05$) y un descenso, en la población anciana ($p < 0,05$). Por otra parte, analizando los tres grupos no encontramos diferencias valorables entre ellos (Tabla XIX).

Figura 2
NIVELES DE CITOQUINAS EN MUESTRAS BASALES Y CONTROLES



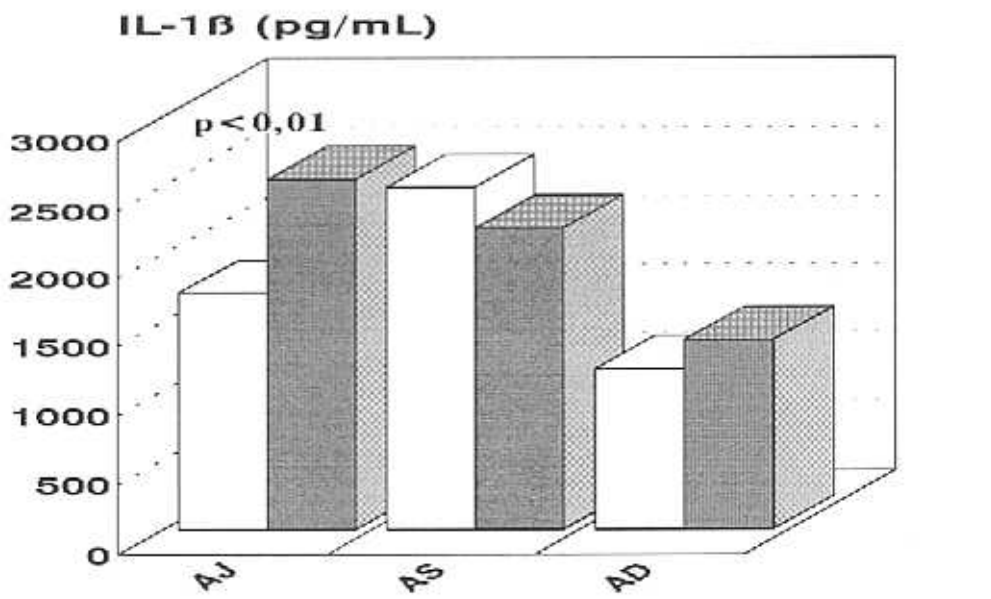
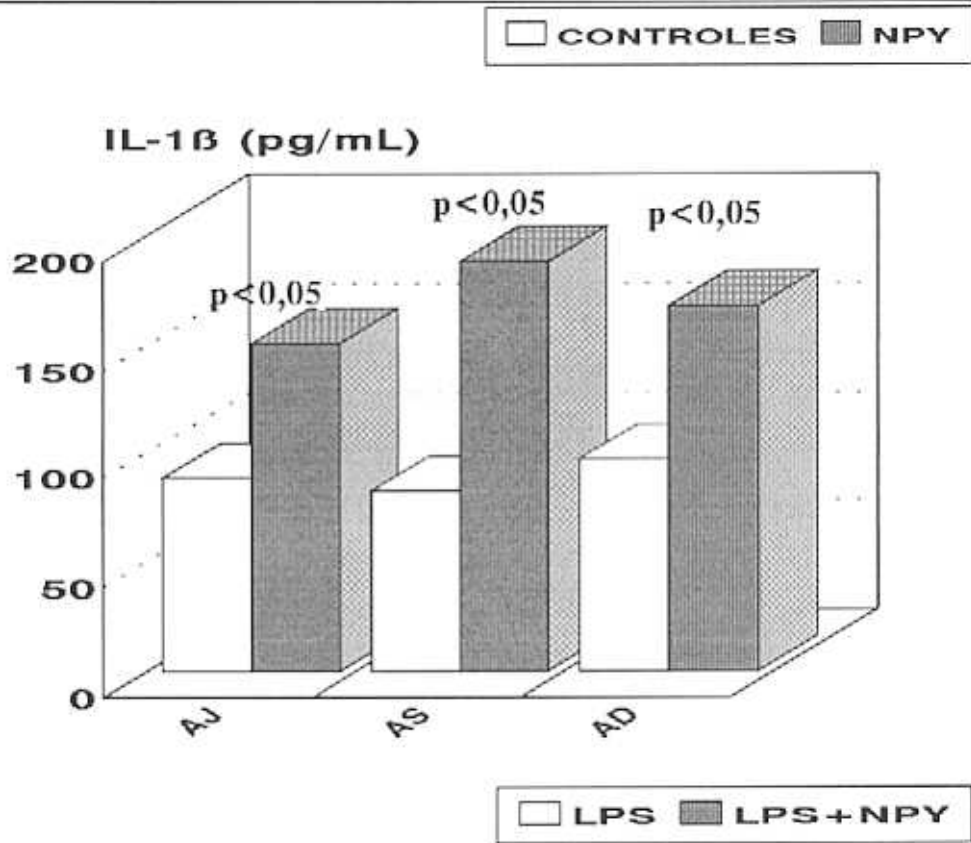
AJ:adultos jóvenes
AS:adultos sanos
AD:ancianos diabéticos

Figura 3
PRODUCCION DE CITOQUINAS TRAS EL ESTIMULO
CON LPS. COMPARACION CON CONTROLES



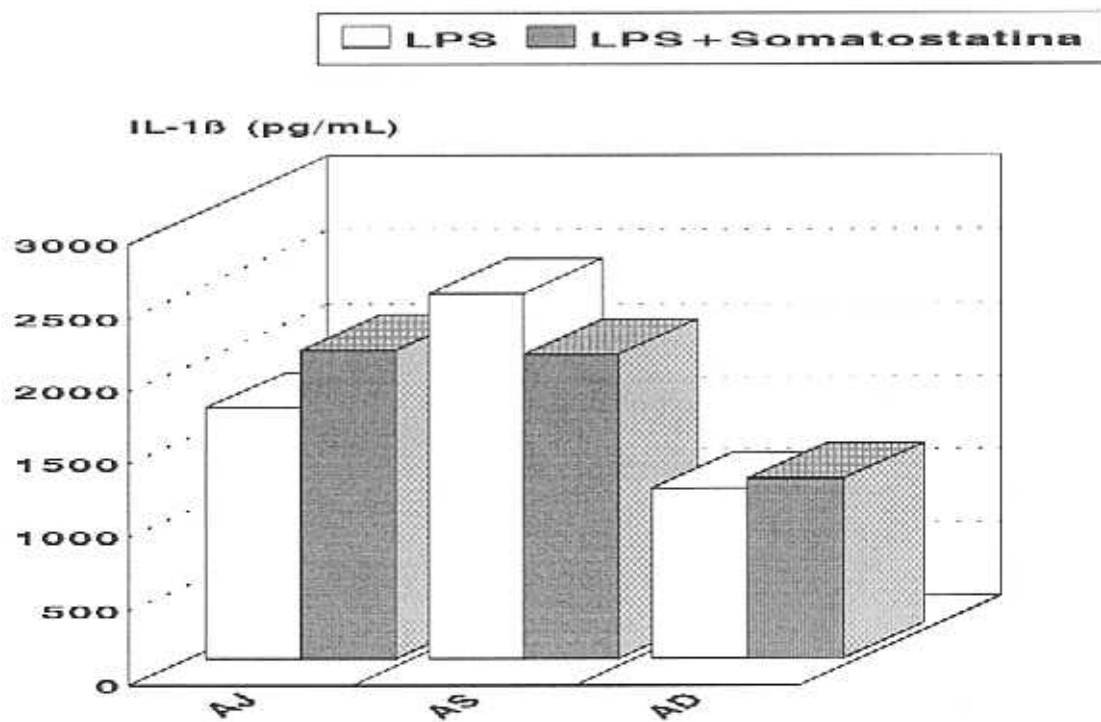
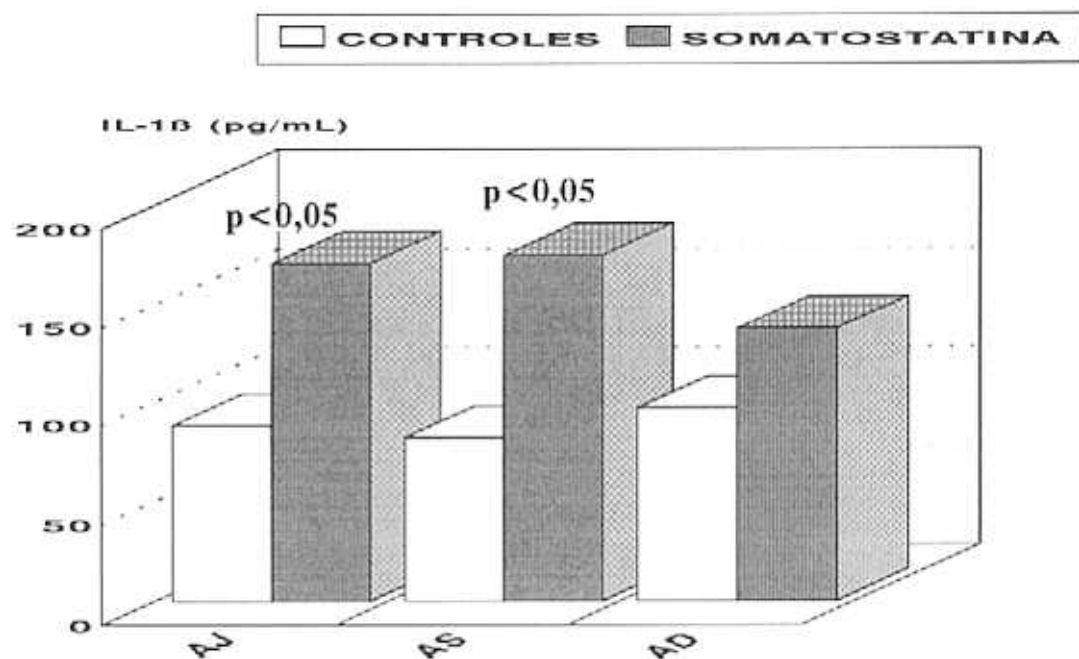
AJ: adultos jóvenes
AS: ancianos sanos
AD: ancianos diabéticos

Figura 4
PRODUCCION DE IL-1 β TRAS ESTIMULACION
CON NPY (Fig. 4a) Y LPS + NPY (Fig. 4b)



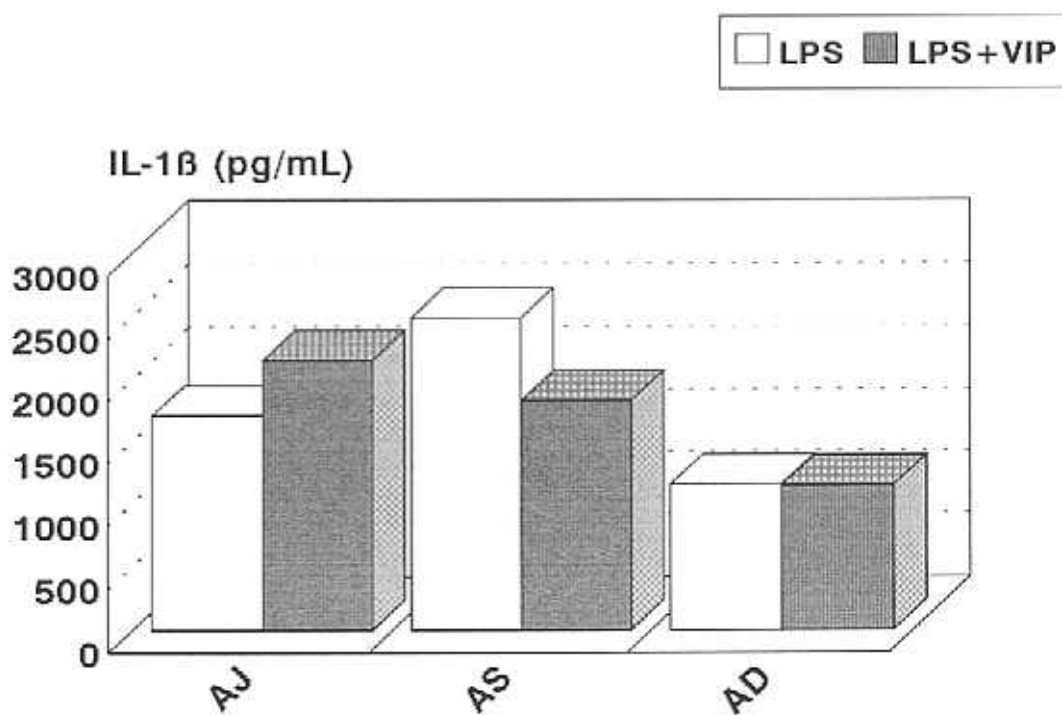
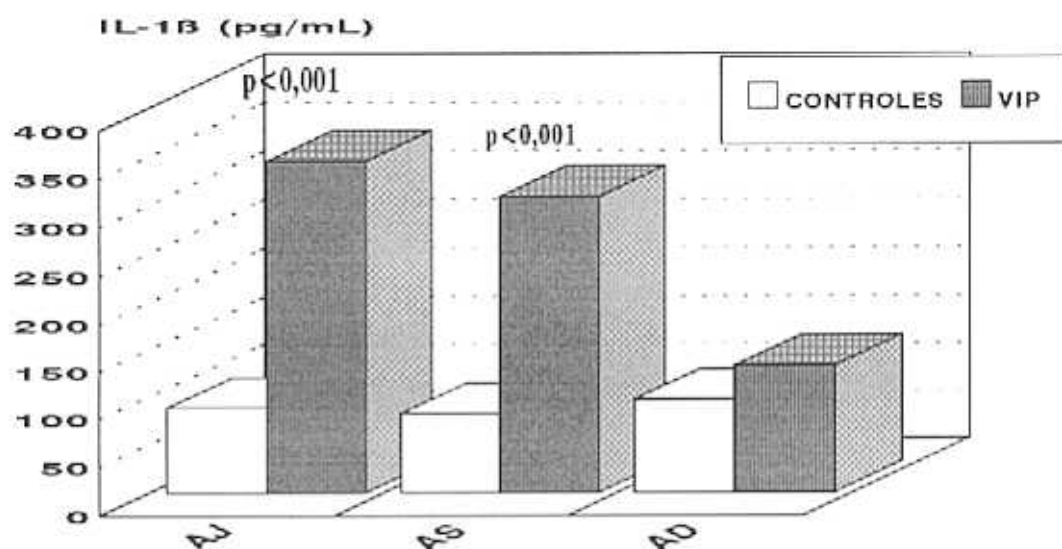
AJ: adultos jóvenes
 AS: ancianos sanos
 AD: ancianos diabéticos

Figura 5
PRODUCCION DE IL-1 β TRAS ESTIMULACION CON
SOMATOSTATINA (Fig. 5a) Y LPS+SOMATOSTATINA (Fig. 5b).



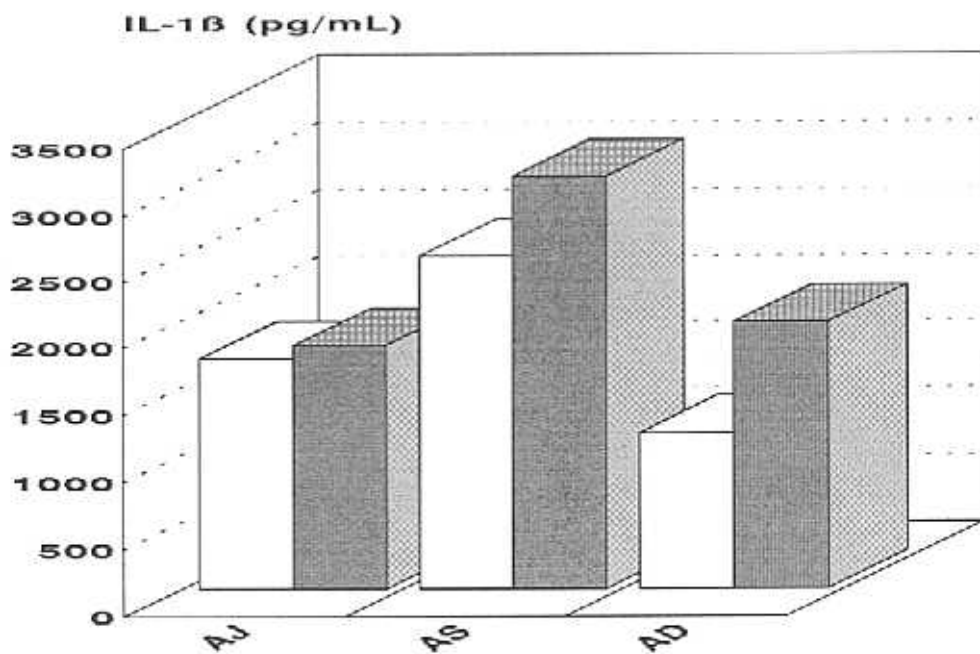
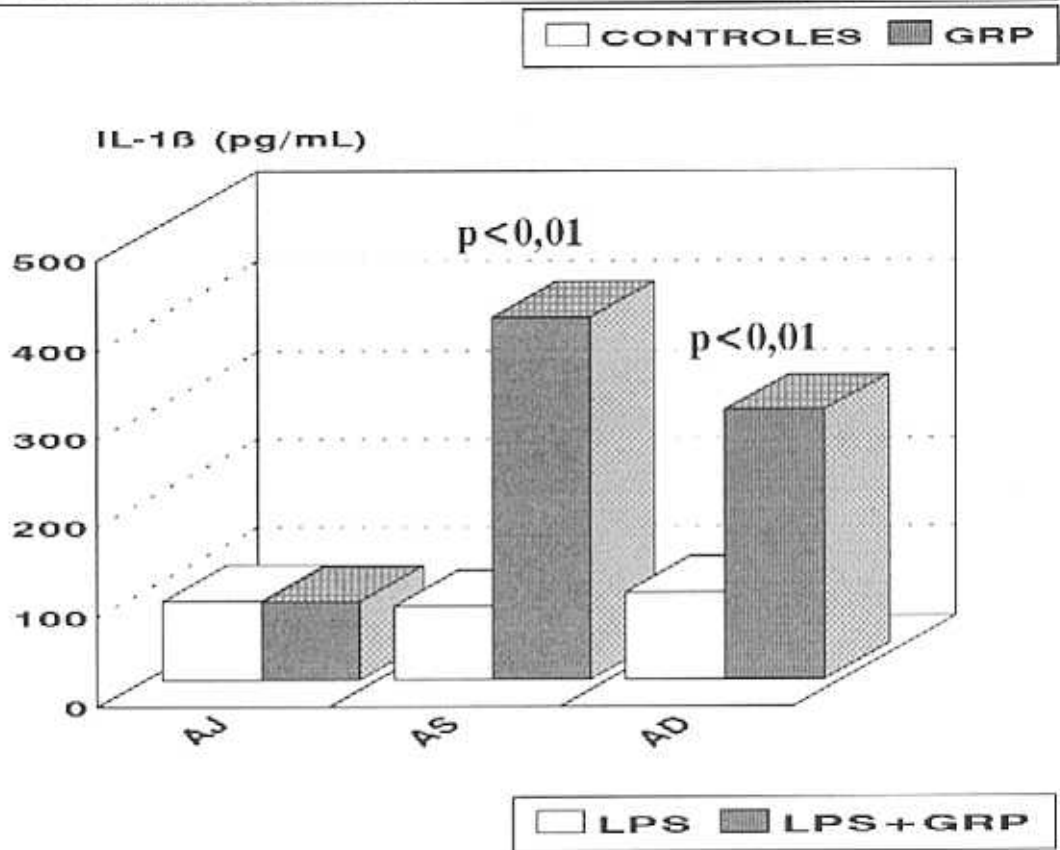
AJ: adlto jóvenes
AS: ancianos sanos
AD: ancianos diabéticos

Figura 6
PRODUCCION DE IL-1 β TRAS ESTIMULACION
CON VIP (Fig. 6a) Y LPS + VIP (Fig. 6b).



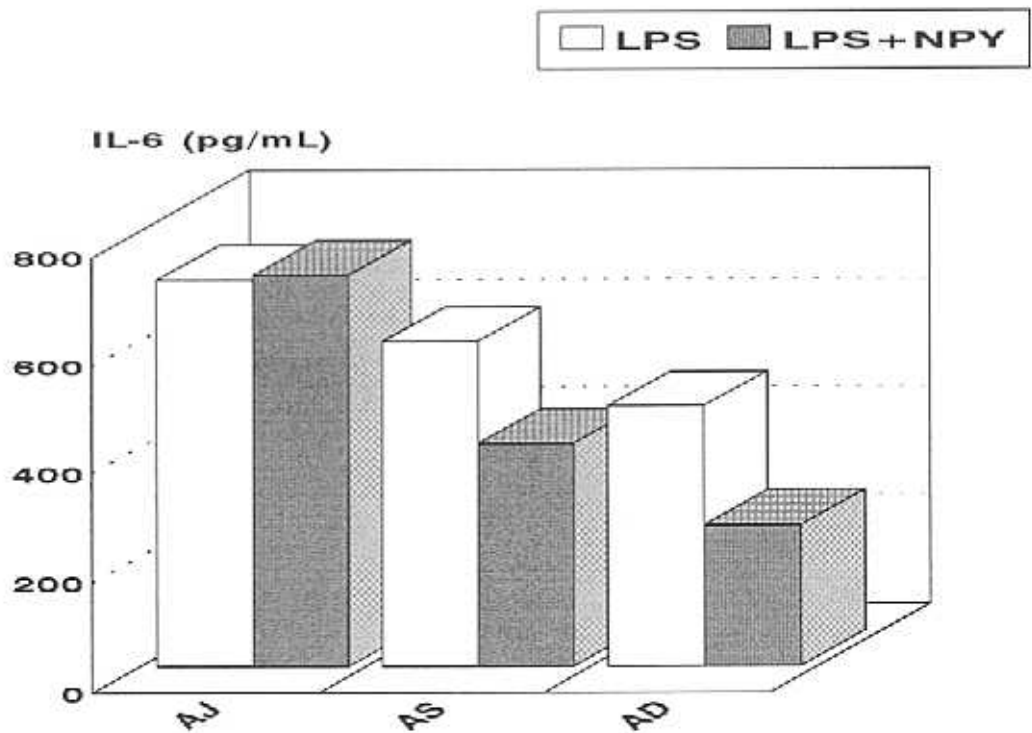
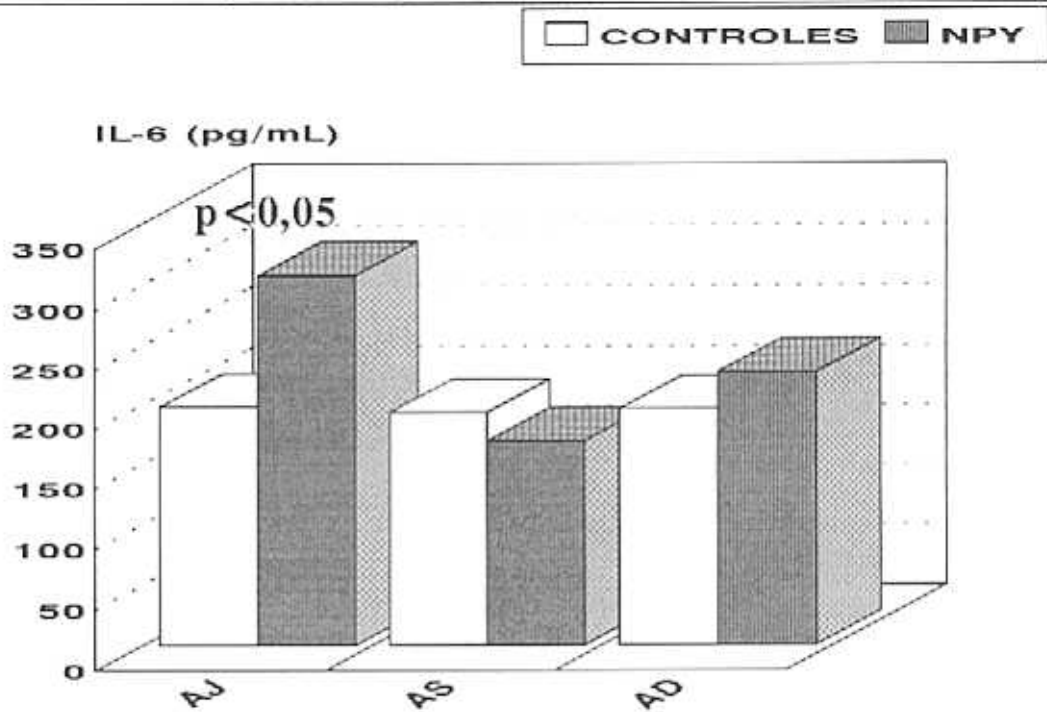
AJ: adultos jóvenes
 AS: ancianos sanos
 AD: ancianos diabéticos

Figura 7
PRODUCCION DE IL-1 β TRAS ESTIMULACION
CON GRP (Fig. 7a) Y LPS + GRP (Fig. 7b)



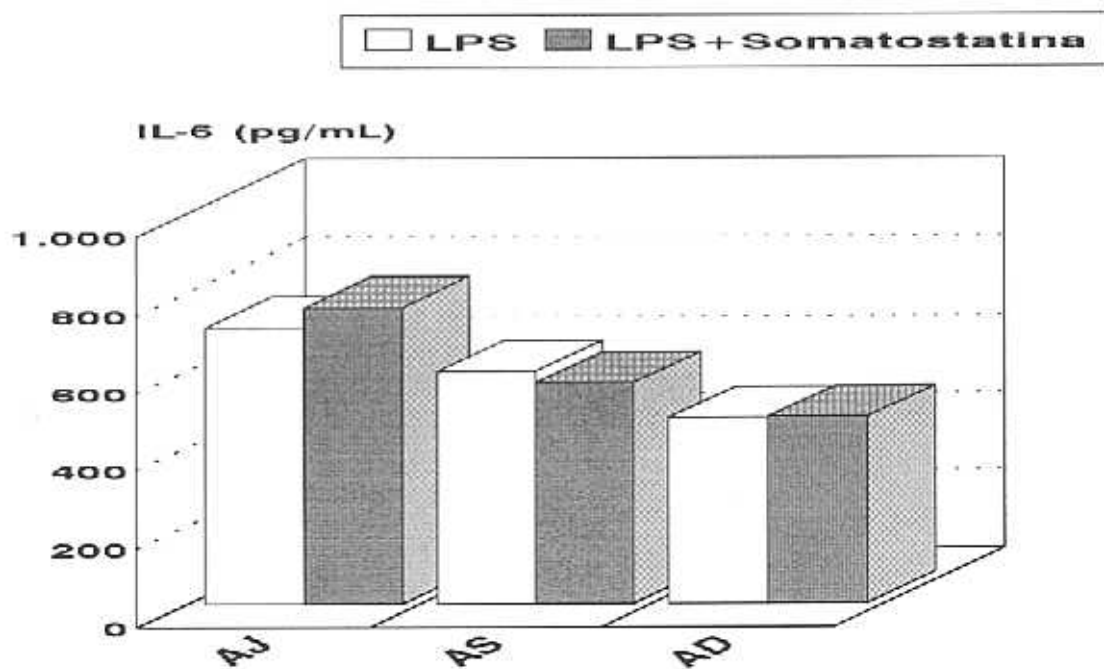
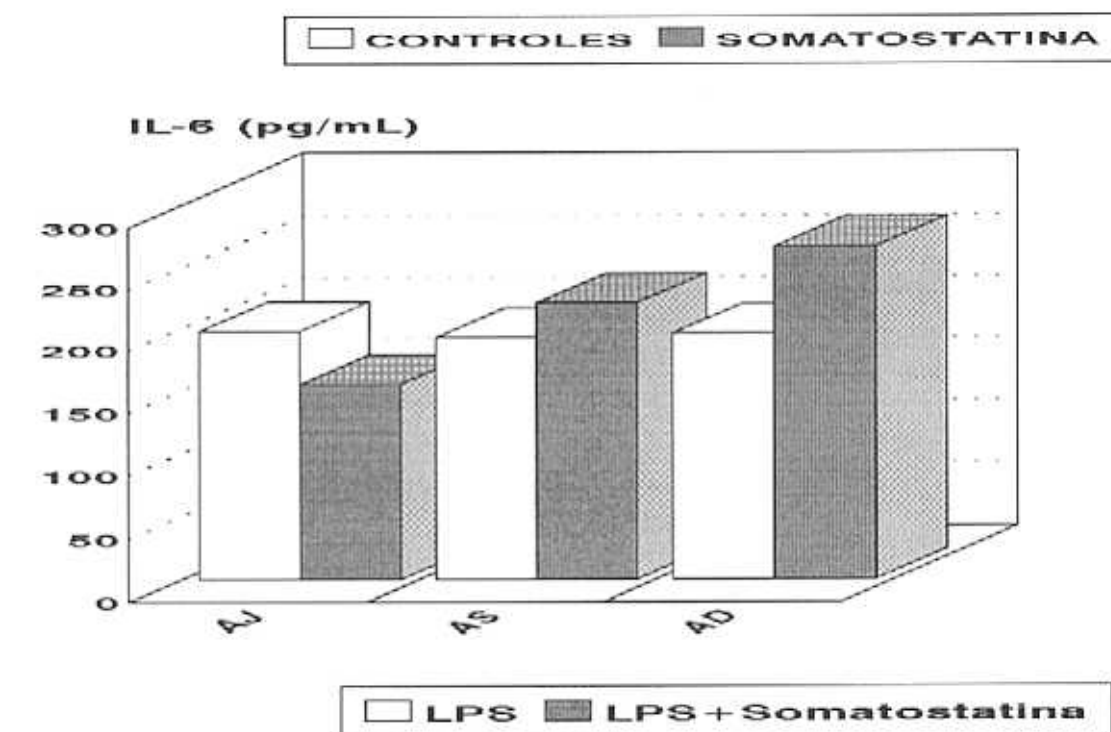
AJ: adultos jóvenes
AS: ancianos sanos
AD: ancianos diabéticos

Figura 8
PRODUCCION DE IL-6 TRAS ESTIMULACION
CON NPY (Fig. 8a) Y LPS + NPY (Fig. 8b).



AJ: adultos jóvenes
 AS: ancianos sanos
 AD: ancianos diabéticos

Figura 9
PRODUCCION DE IL-6 TRAS ESTIMULACION CON
SOMATOSTATINA (Fig. 9a) Y LPS + SOMATOSTATINA (Fig. 9b).



AJ: adultos jóvenes
AS: ancianos sanos
AD: ancianos diabéticos

Figura 10
PRODUCCION DE IL-6 TRAS ESTIMULACION
CON VIP (Fig. 10a) Y LPS + VIP (Fig. 10b).

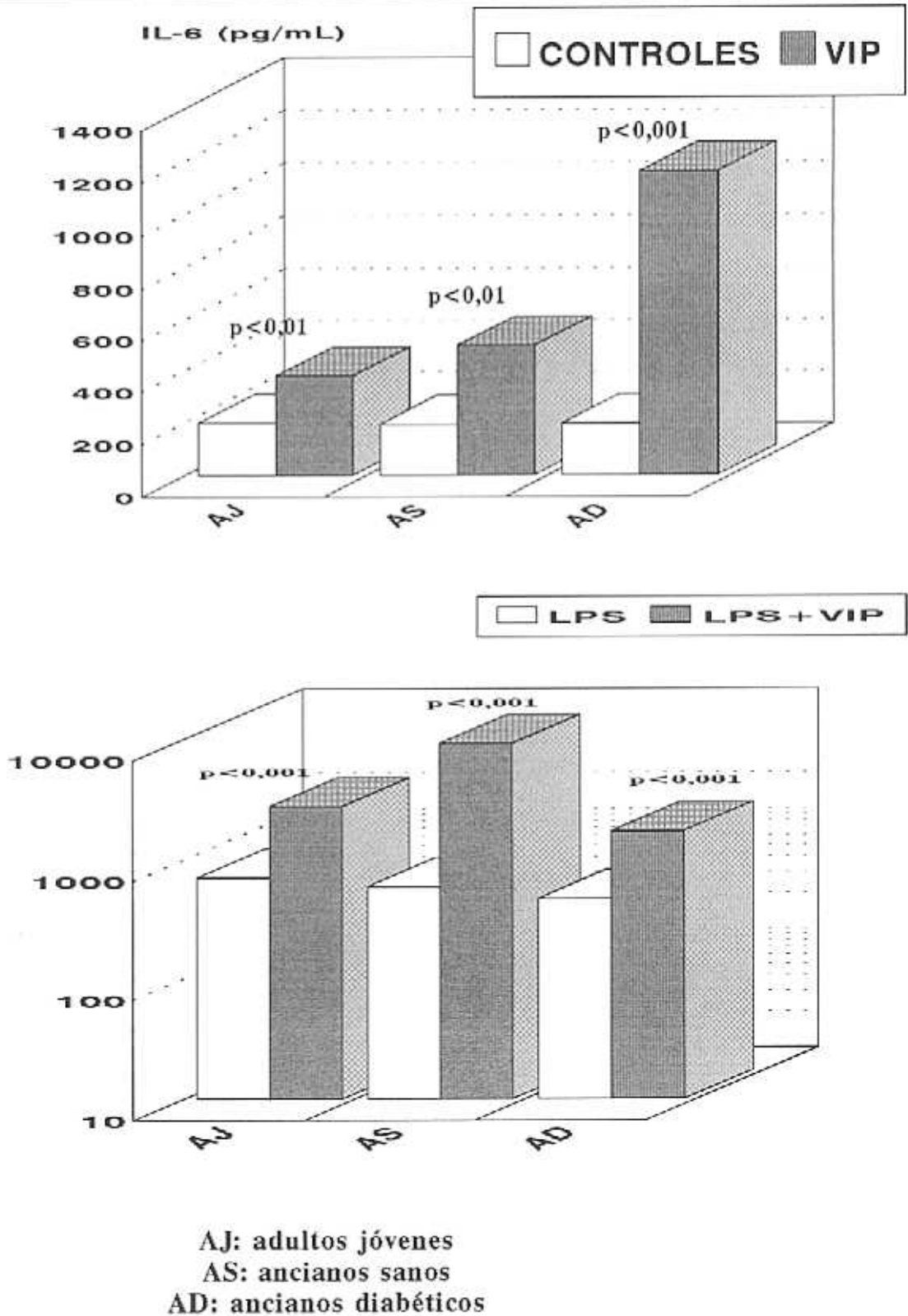
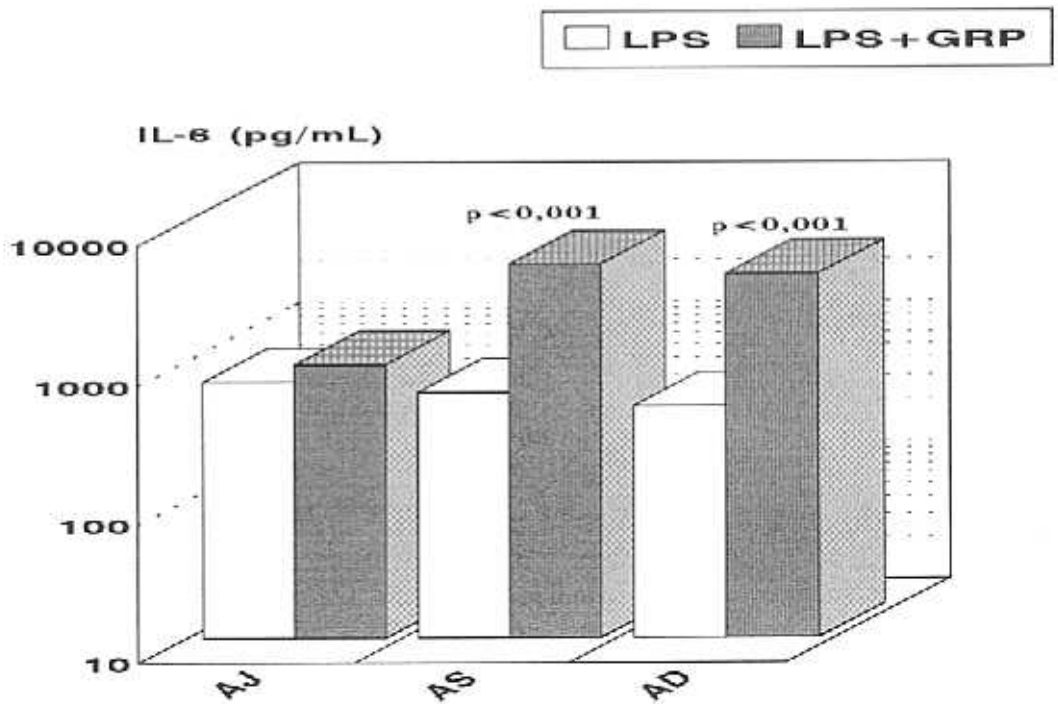
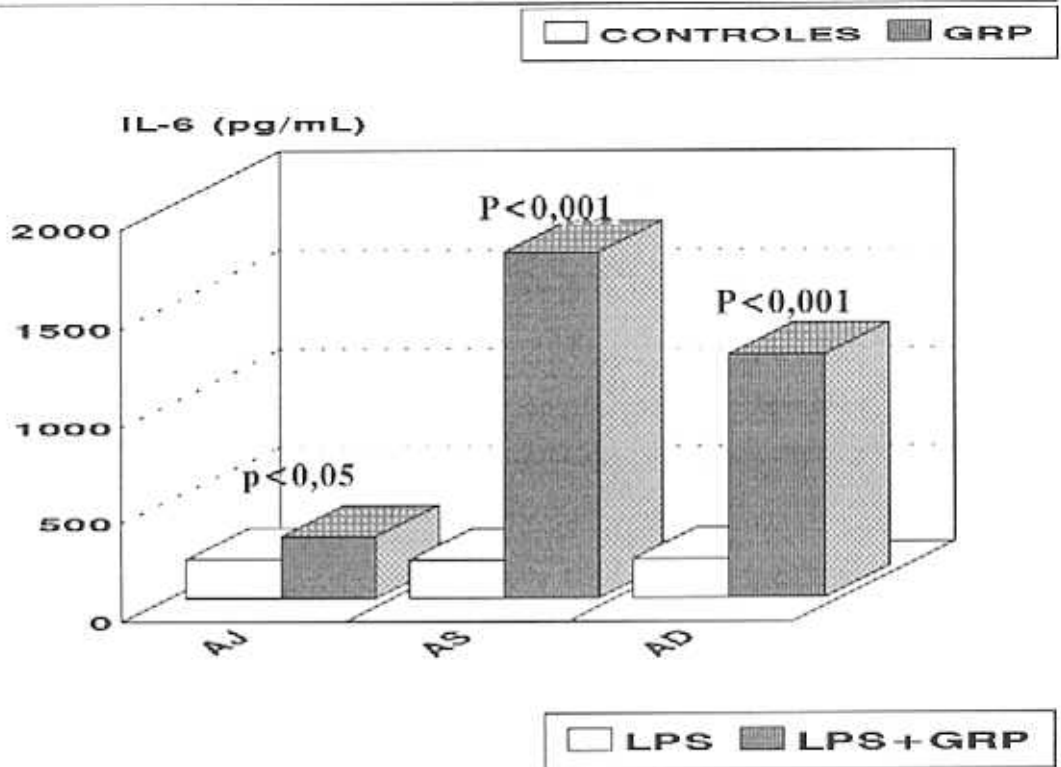
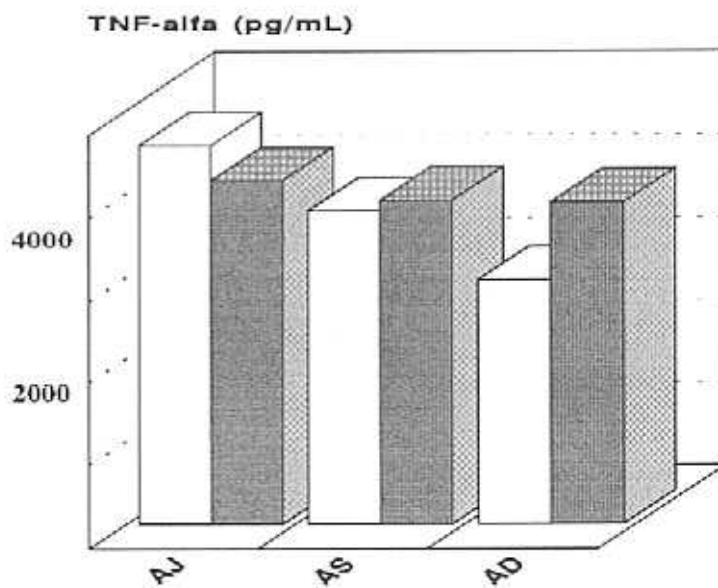
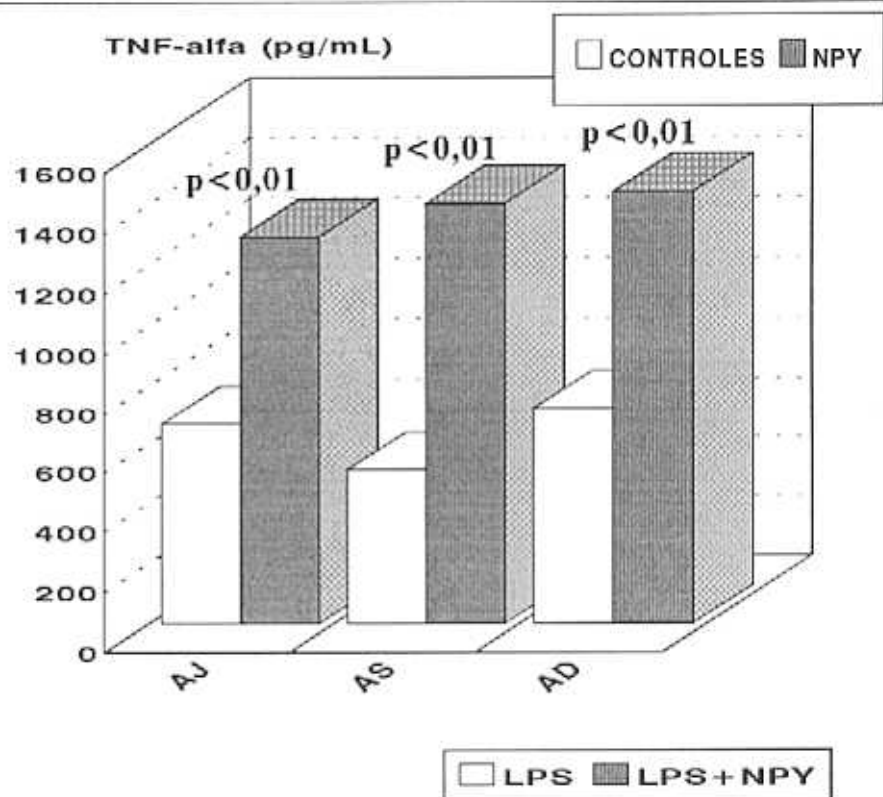


Figura 11
PRODUCCION DE IL-6 TRAS ESTIMULACION
CON GRP (Fig. 11a) Y LPS + GRP (Fig. 11b).



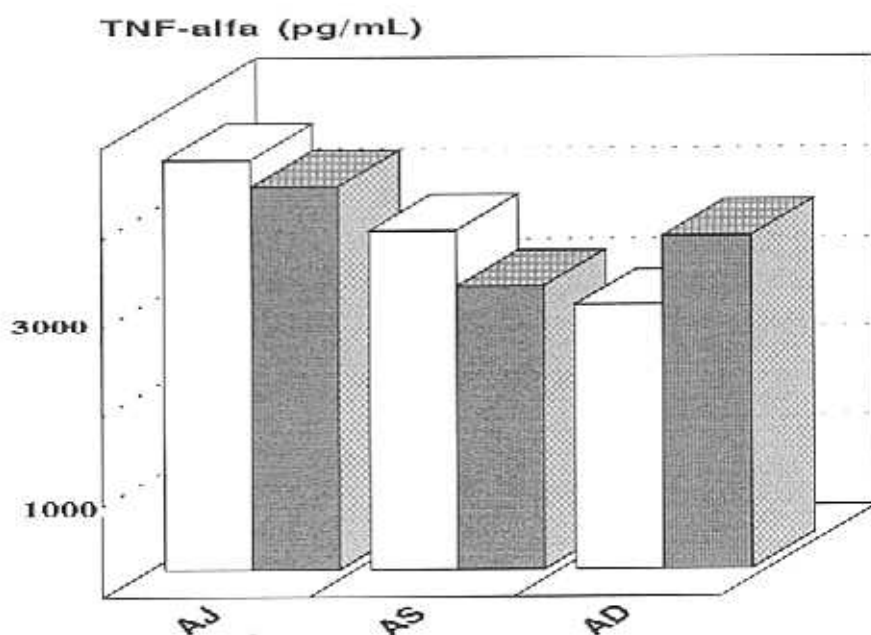
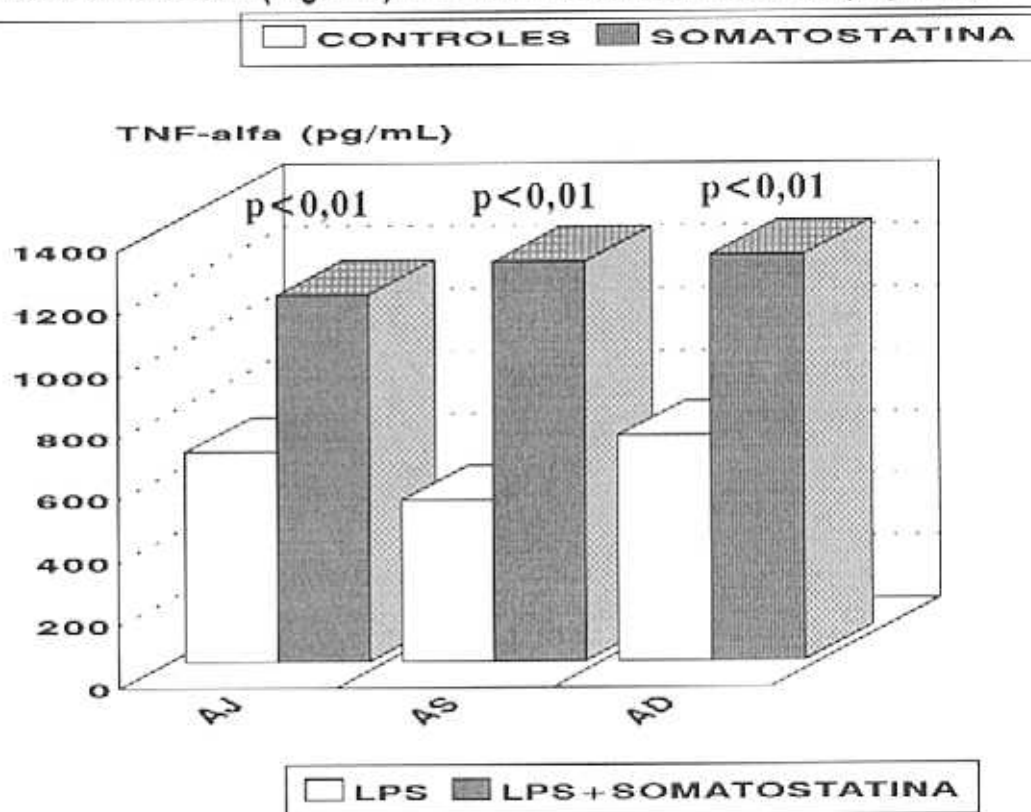
AJ: adultos jóvenes
AS: ancianos sanos
AD: ancianos diabéticos

Figura 12
PRODUCCION DE TNF-alfa TRAS ESTIMULACION
CON NPY (Fig. 12a) Y LPS + NPY (Fig. 12b).



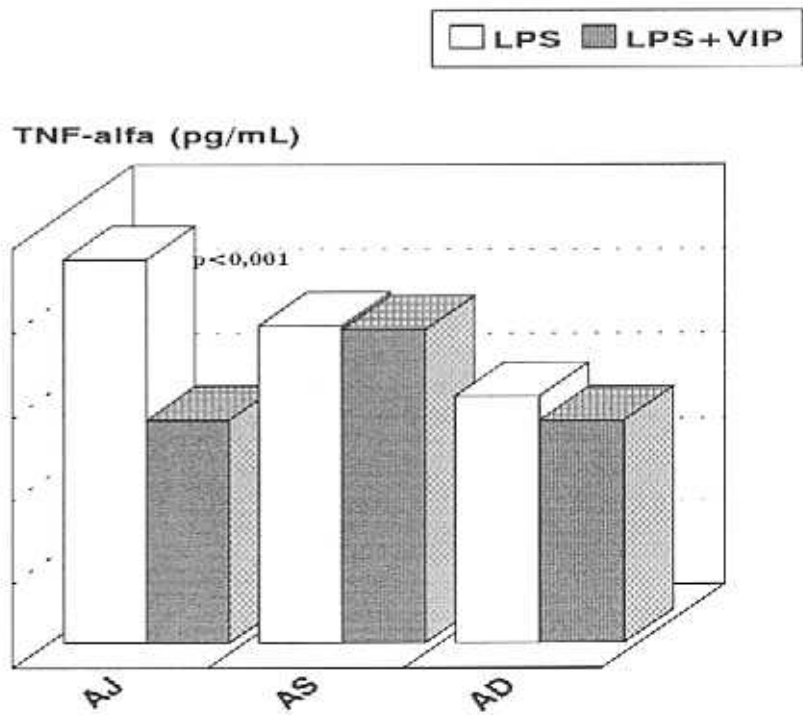
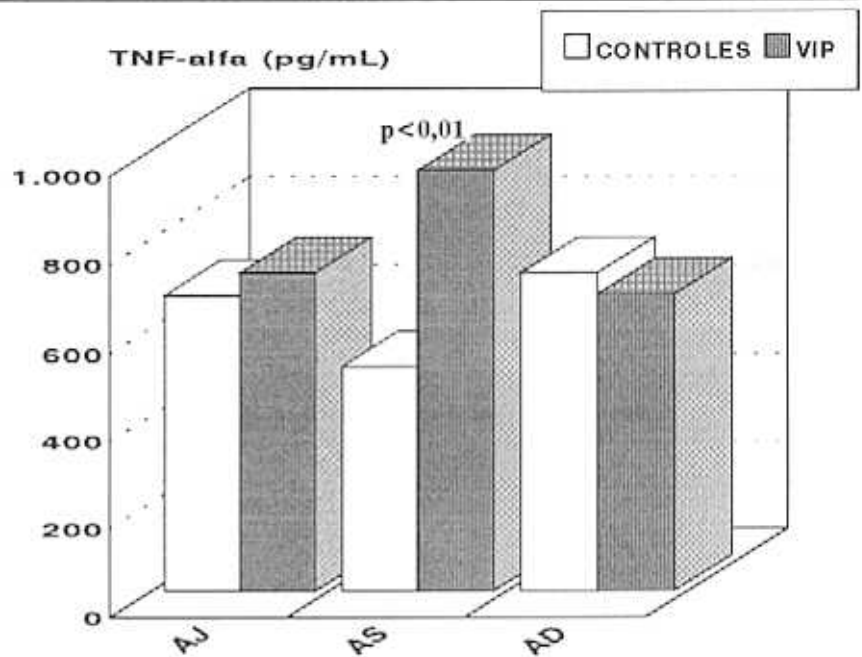
AJ: adultos jóvenes
 AS: ancianos sanos
 AD: ancianos diabéticos

Figura 13
PRODUCCION DE TNF-alfa TRAS ESTIMULACION CON
SOMATOSTATINA (Fig.13a) Y LPS + SOMATOSTATINA (Fig.13b).



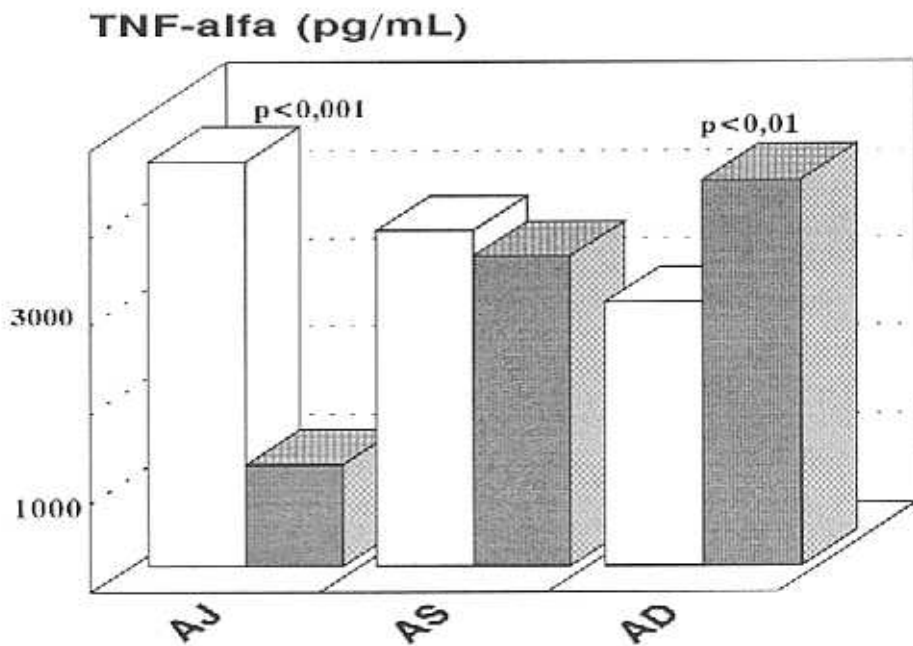
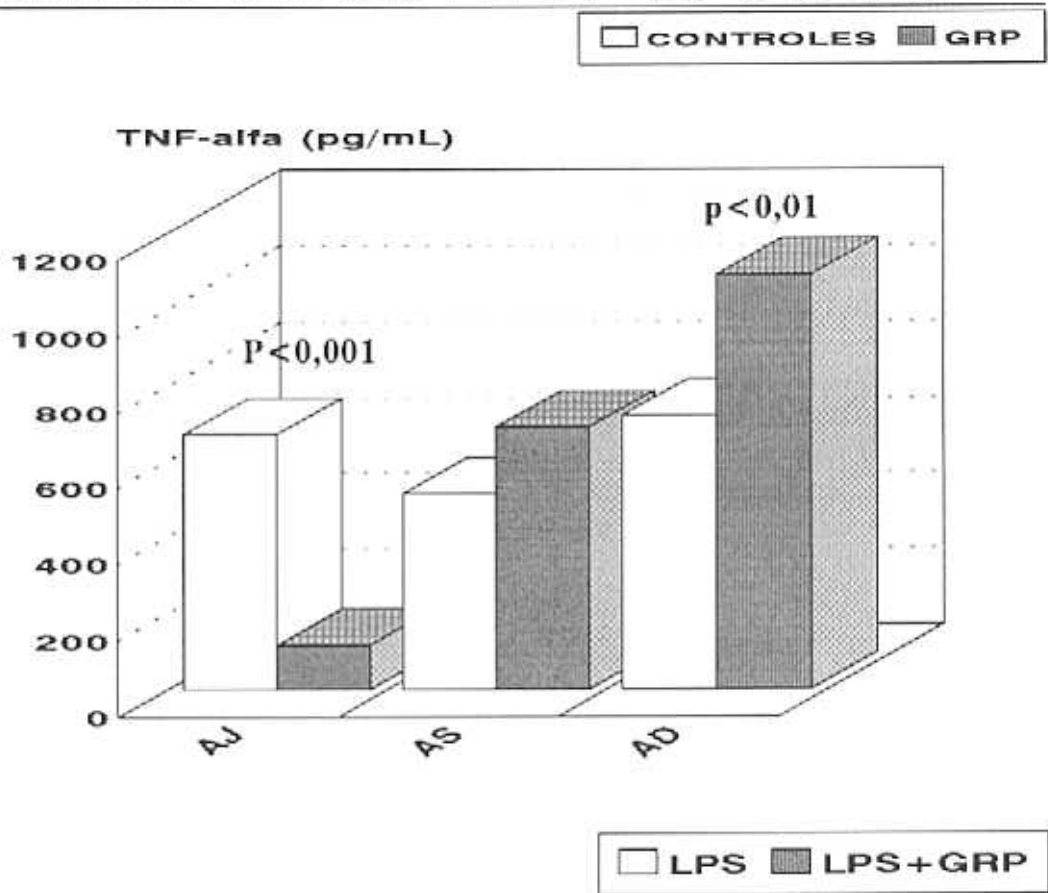
AJ: adultos jóvenes
AS: ancianos sanos
AD: ancianos diabéticos

Figura 14
PRODUCCION DE TNF-alfa TRAS ESTIMULACION
CON VIP (Fig. 14a) Y LPS + VIP (Fig.14b).



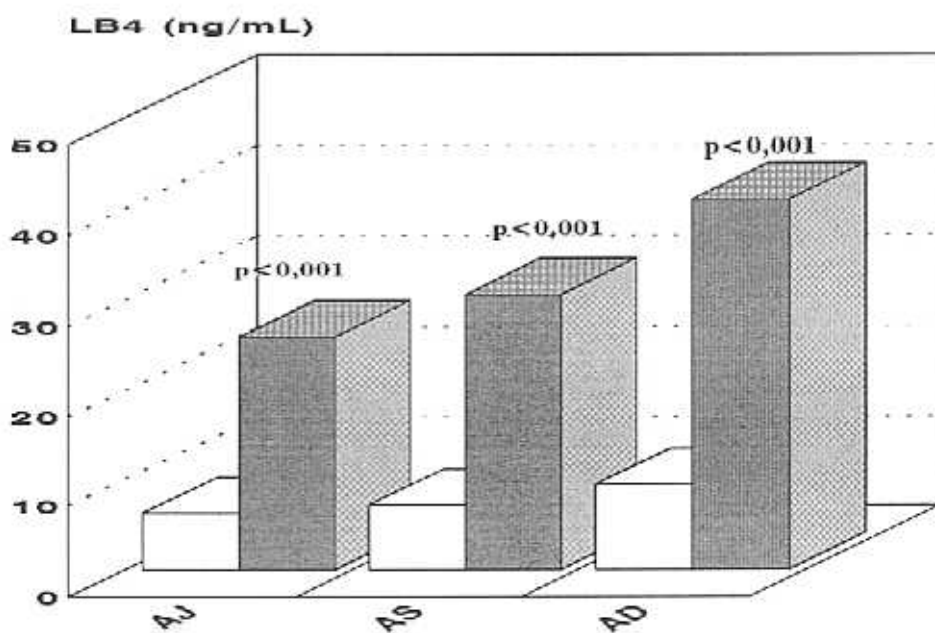
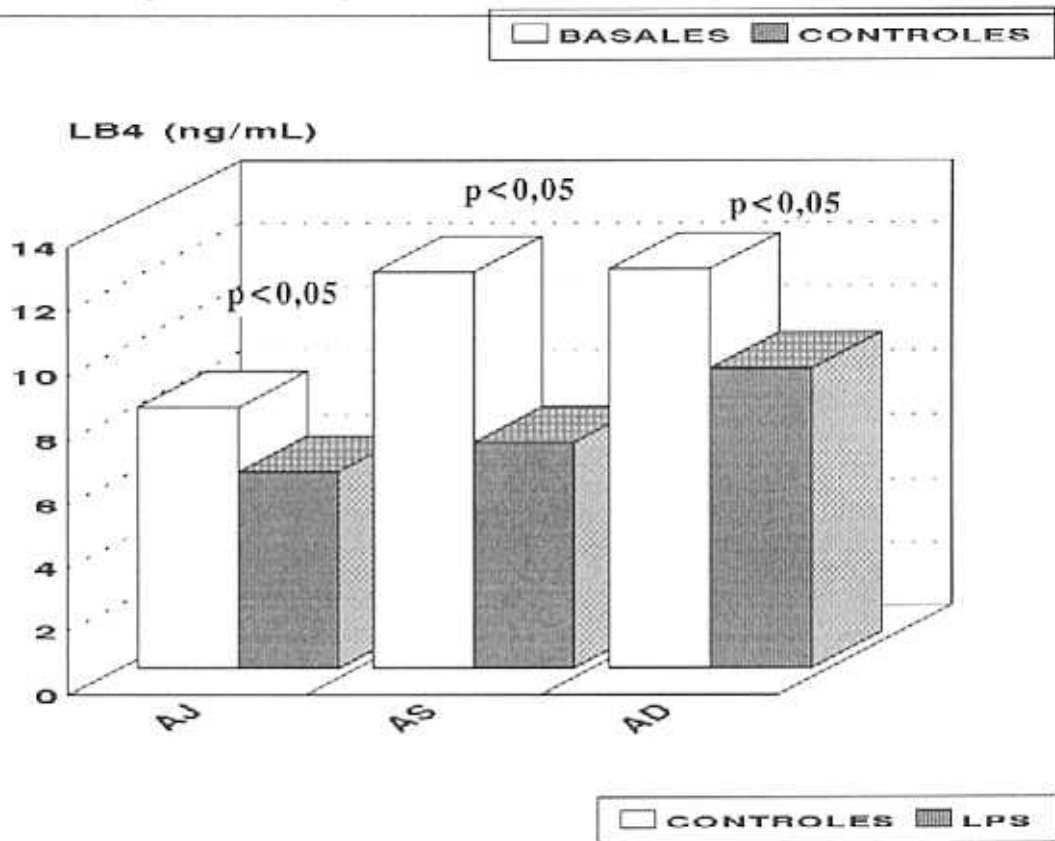
AJ: ancianos jóvenes
 AS: ancianos sanos
 AD: ancianos diabéticos

Figura 15
PRODUCCION DE TNF-alfa TRAS ESTIMULACION
CON GRP (Fig. 15a) Y LPS + GRP (Fig. 15b).



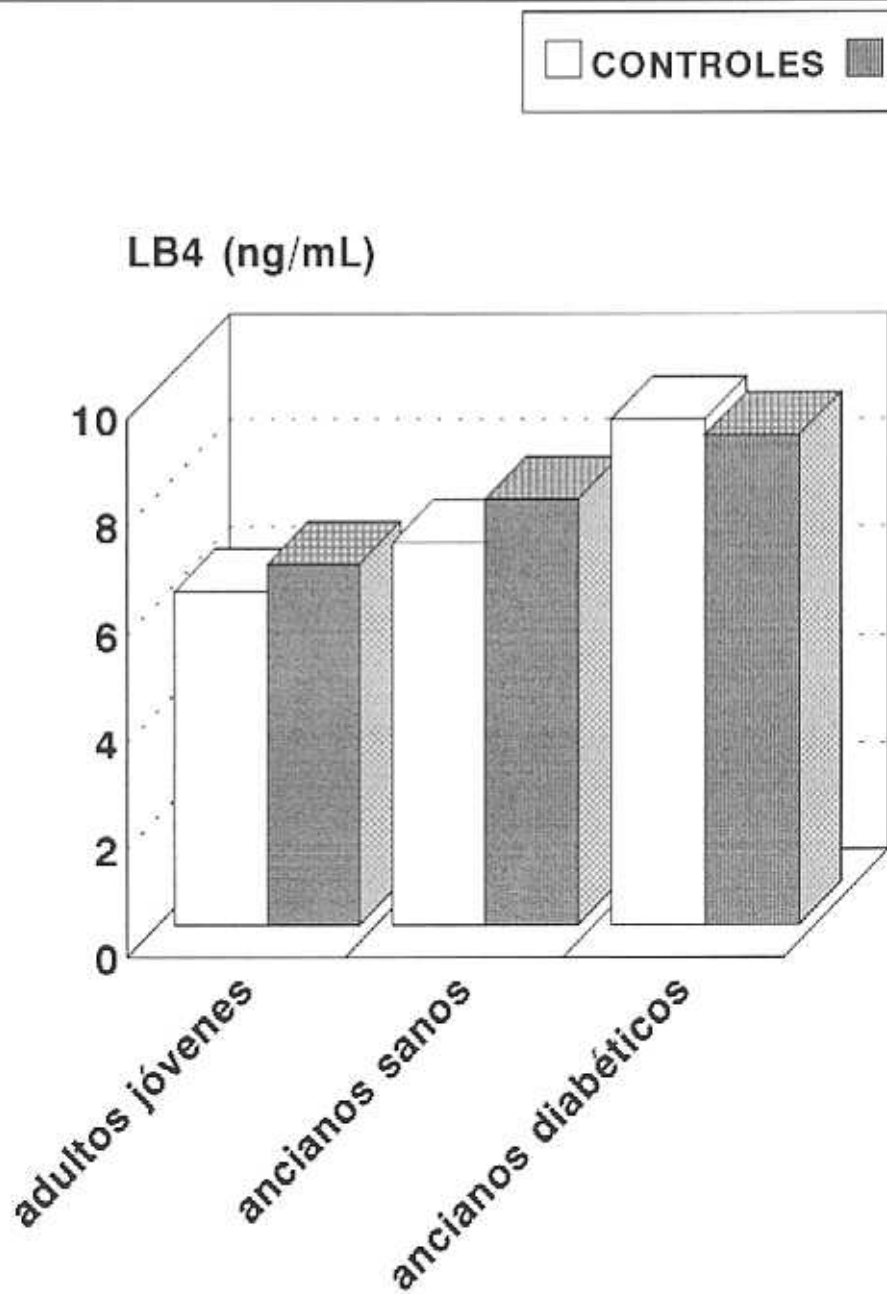
AJ: adultos jóvenes
 AS: ancianos sanos
 AD: ancianos diabéticos

Figura 16
PRODUCCION BASAL DE LB4 TRAS UNA INCUBACION DE 30 MIN (CONTROLES) Y TRAS LA ESTIMULACION CON LPS



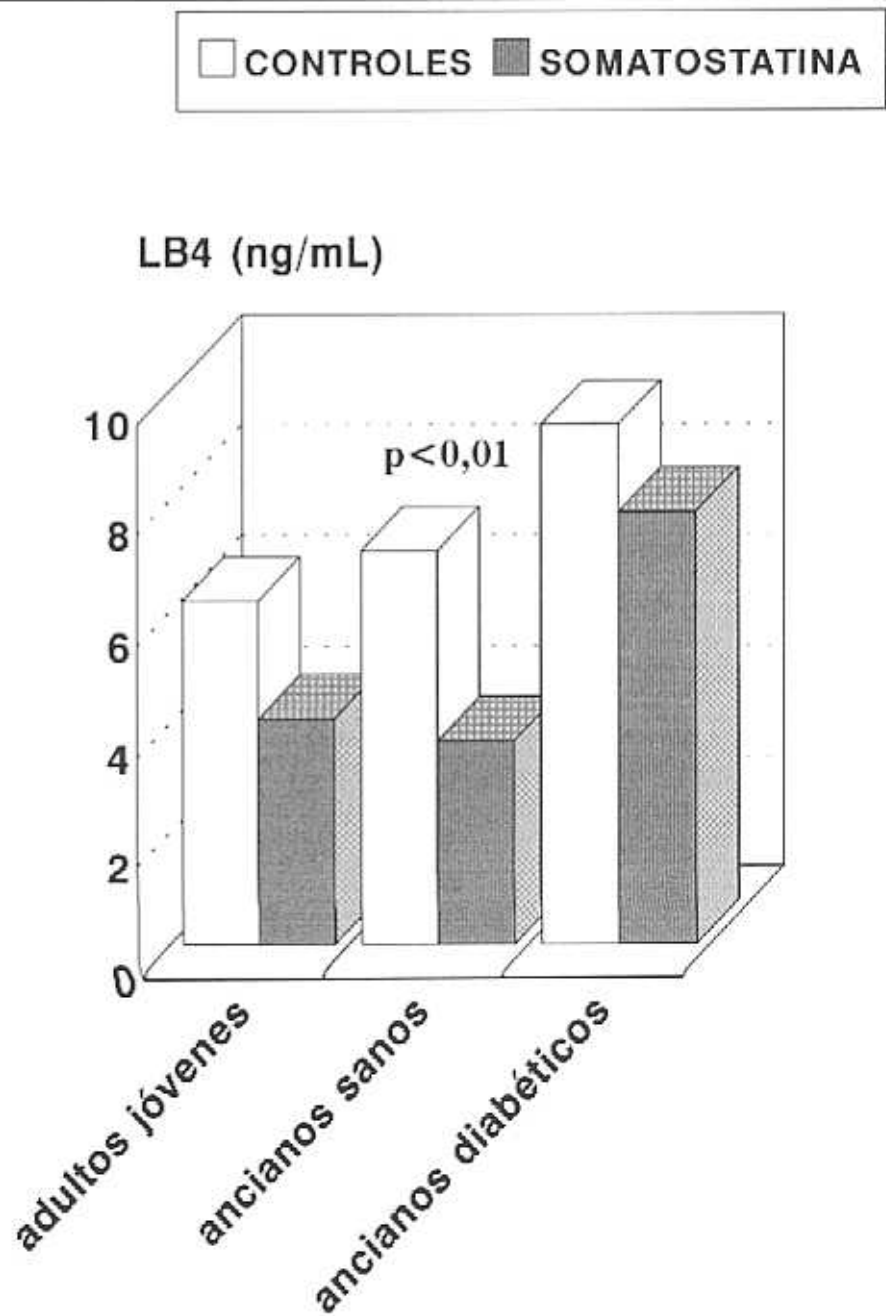
AJ: adultos jóvenes
AS: ancianos sanos
AD: ancianos diabéticos

Figura 17
PRODUCCION DE LB4 EN RESPUESTA AL
ESTIMULO CON NPY. COMPARACION CON CONTROLES



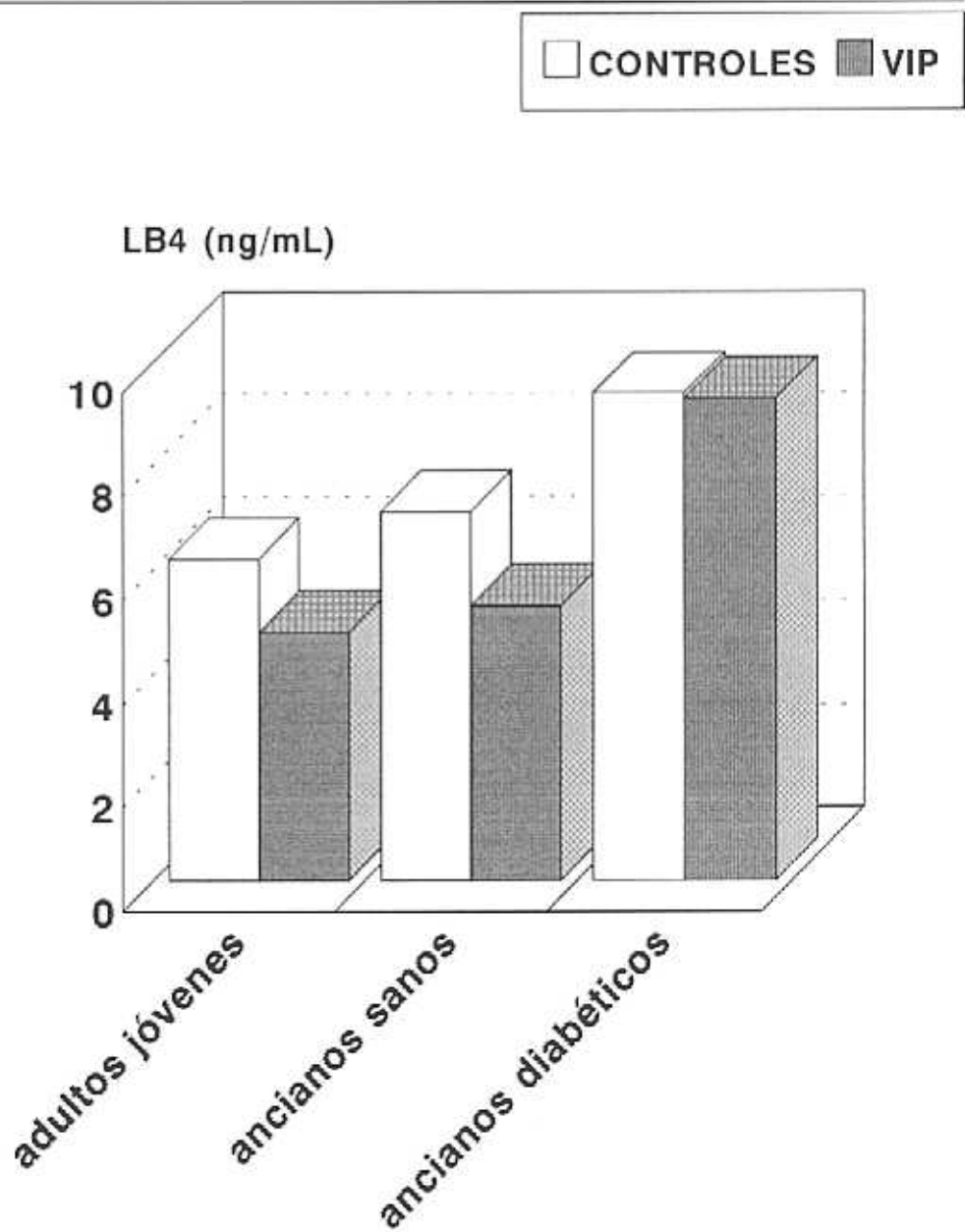
CONTROLES	6,2 ± 1,2	7,1 ± 2,3	9,4 ± 0,5
NPY	6,7 ± 0,9	7,9 ± 1,3	9,1 ± 2,3

Figura 18
PRODUCCION DE LB4 EN RESPUESTA AL ESTIMULO
CON SOMATOSTATINA. COMPARACION CON CONTROLES



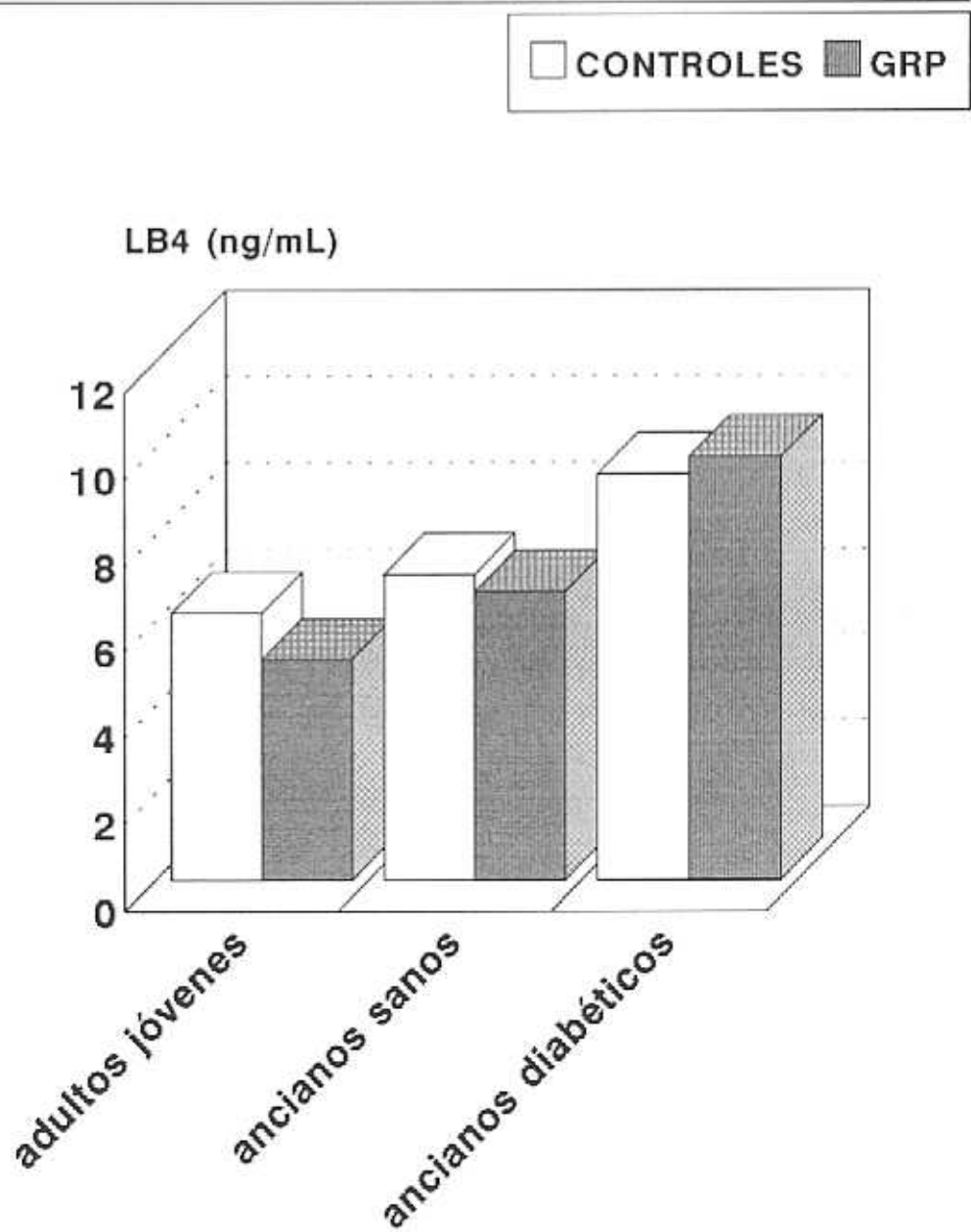
CONTROLES	6,2±1,2	7,1±2,3	9,4±0,5
SOMATOSTATINA	4,1±1,5	3,7±1,6	7,8±2,2

Figura 19
PRODUCCION DE LB4 EN RESPUESTA AL ESTIMULO
CON VIP. COMPARACION CON CONTROLES



CONTROLES	6,2 ± 1,2	7,1 ± 2,3	9,4 ± 0,5
VIP	4,8 ± 1,6	5,3 ± 0,6	9,3 ± 0,7

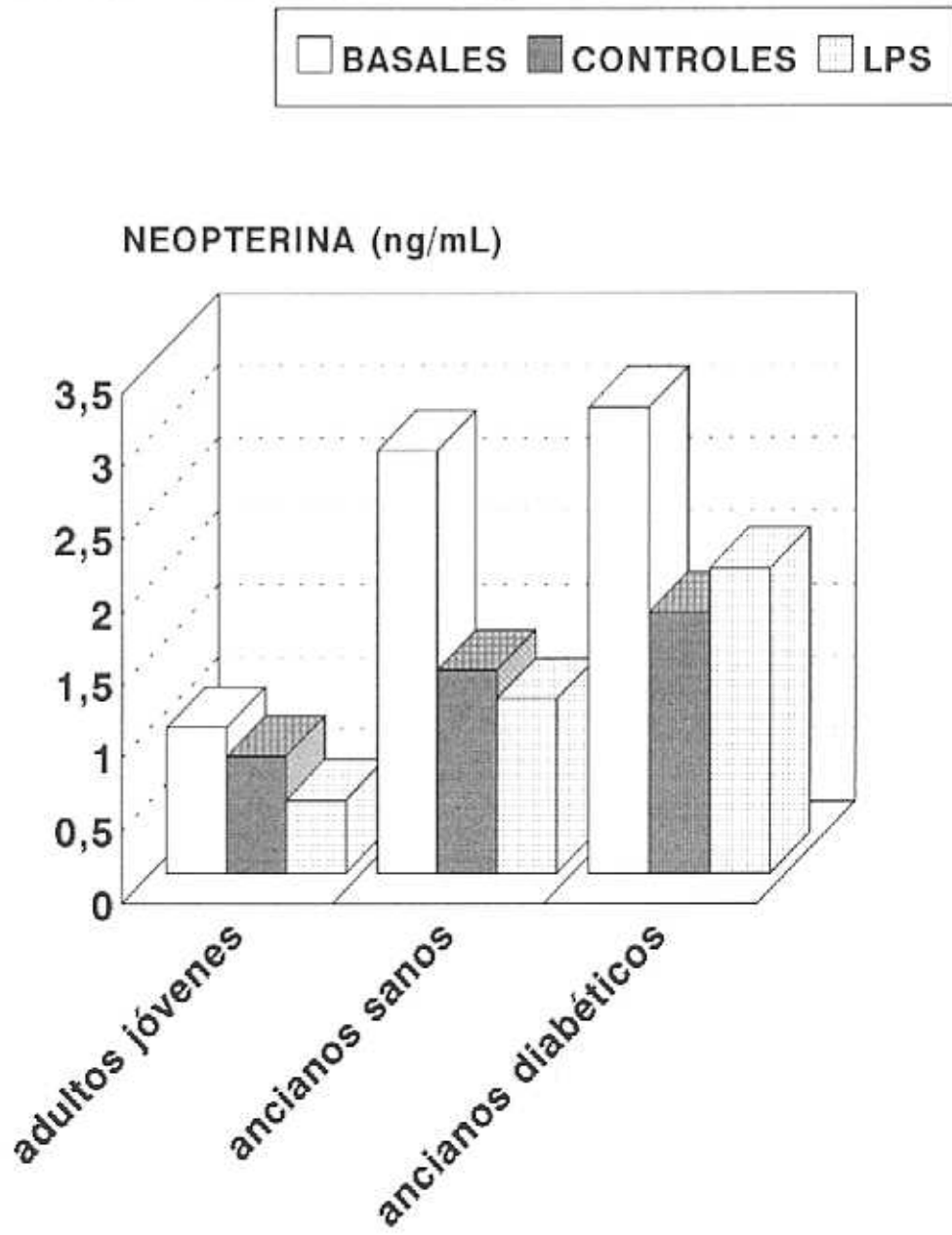
Figura 20
PRODUCCION DE LB4 EN RESPUESTA AL ESTIMULO
CON GRP. COMPARACION CON CONTROLES



CONTROLES	6,2 ± 1,2	7,1 ± 2,3	9,4 ± 0,5
GRP	5,1 ± 2,6	6,7 ± 2,4	9,8 ± 0,5

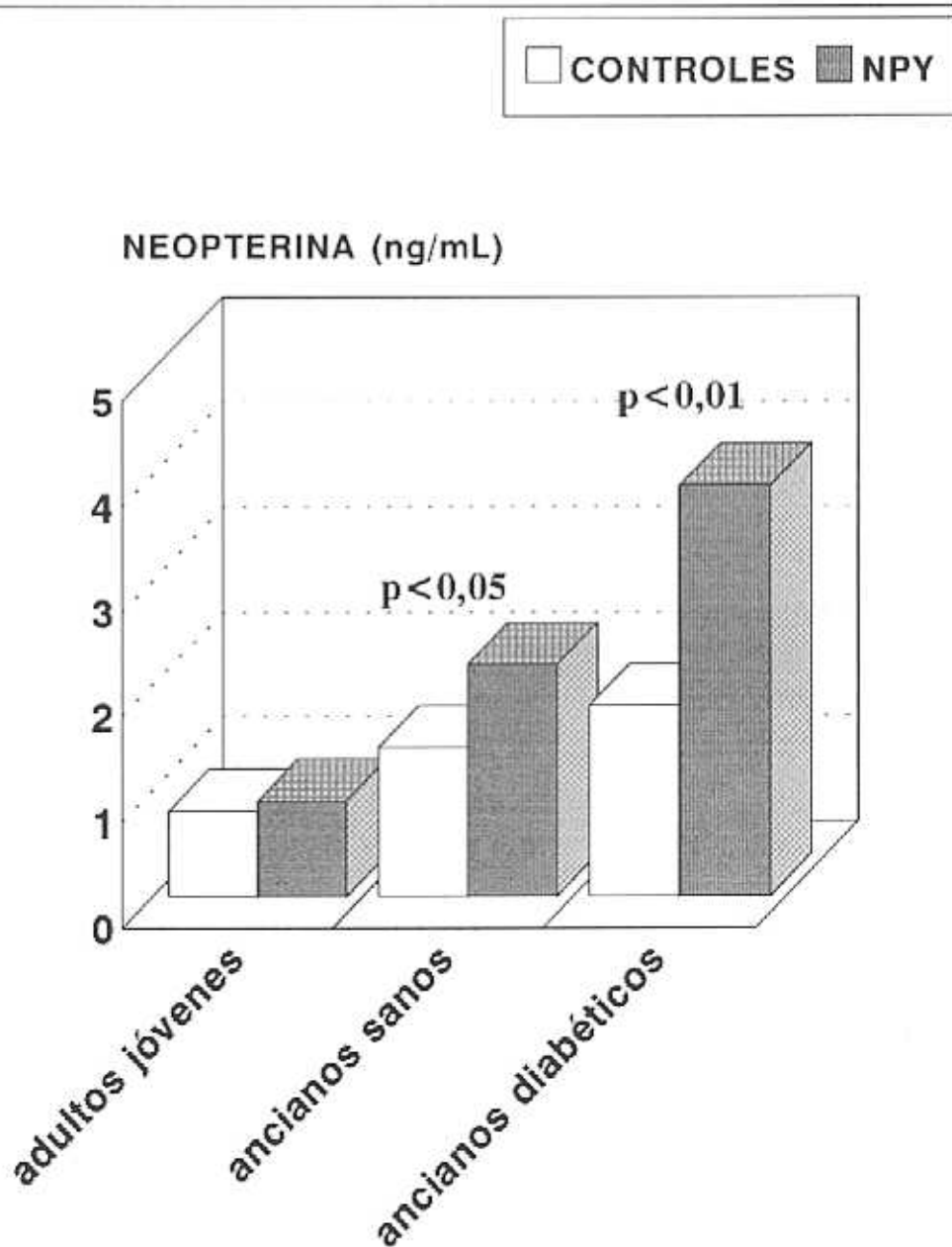
Figura 21

PRODUCCION BASAL DE NEOPTERINA, TRAS UNA INCUBACION DE 30 MIN. Y TRAS LA ESTIMULACION CON LPS



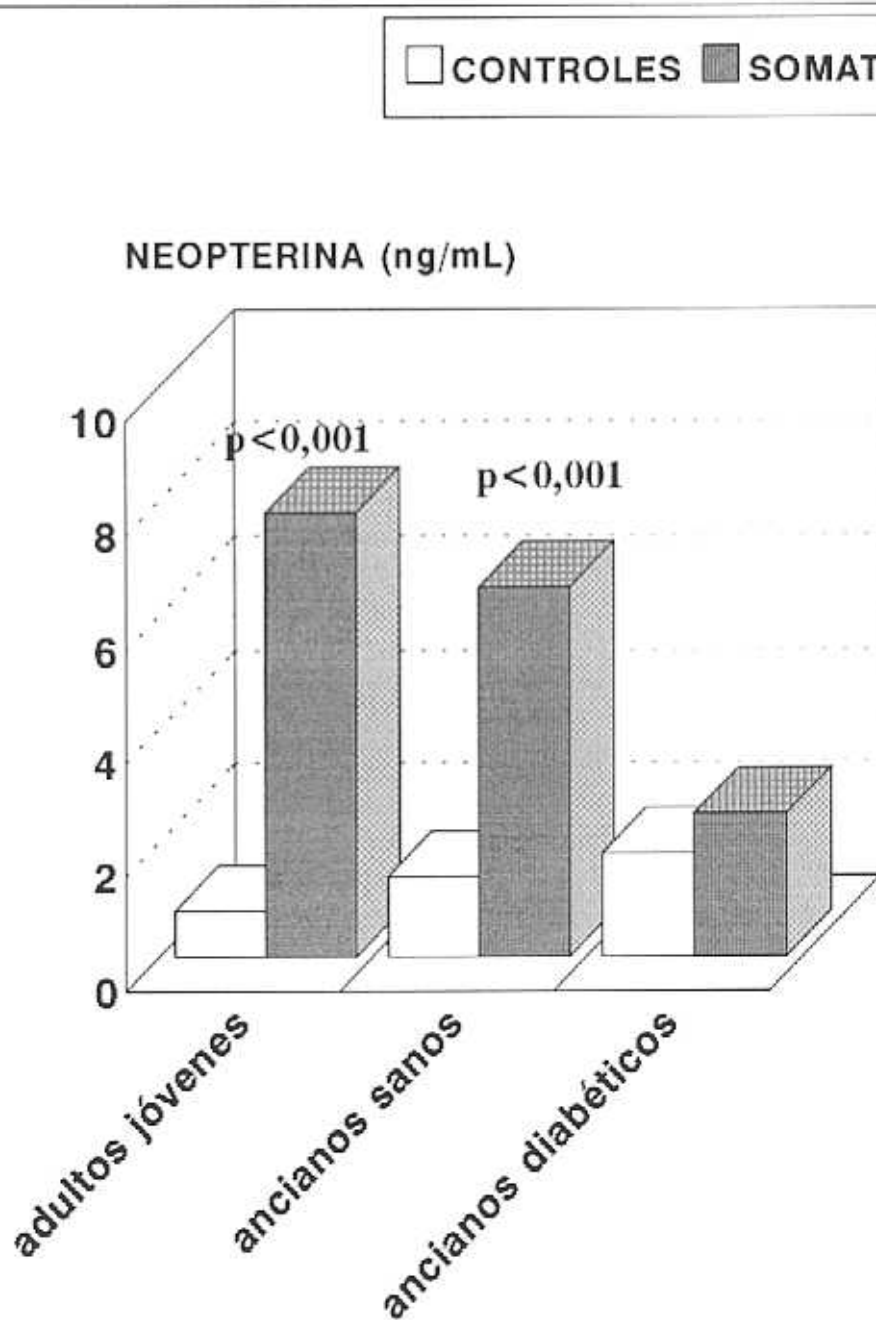
BASALES	1 ± 0,2	2,9 ± 0,7	3,2 ± 0,6
CONTROLES	0,8 ± 0,3	1,4 ± 0,2	1,8 ± 0,4
LPS	0,5 ± 0,2	1,2 ± 0,1	2,1 ± 0,3

Figura 22
PRODUCCION DE NEOPTERINA EN RESPUESTA AL ESTIMULO CON NPY. COMPARACION CON CONTROLES



CONTROLES	0,8 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,4
NPY	0,9 ± 0,2	2,2 ± 0,6	3,9 ± 0,4

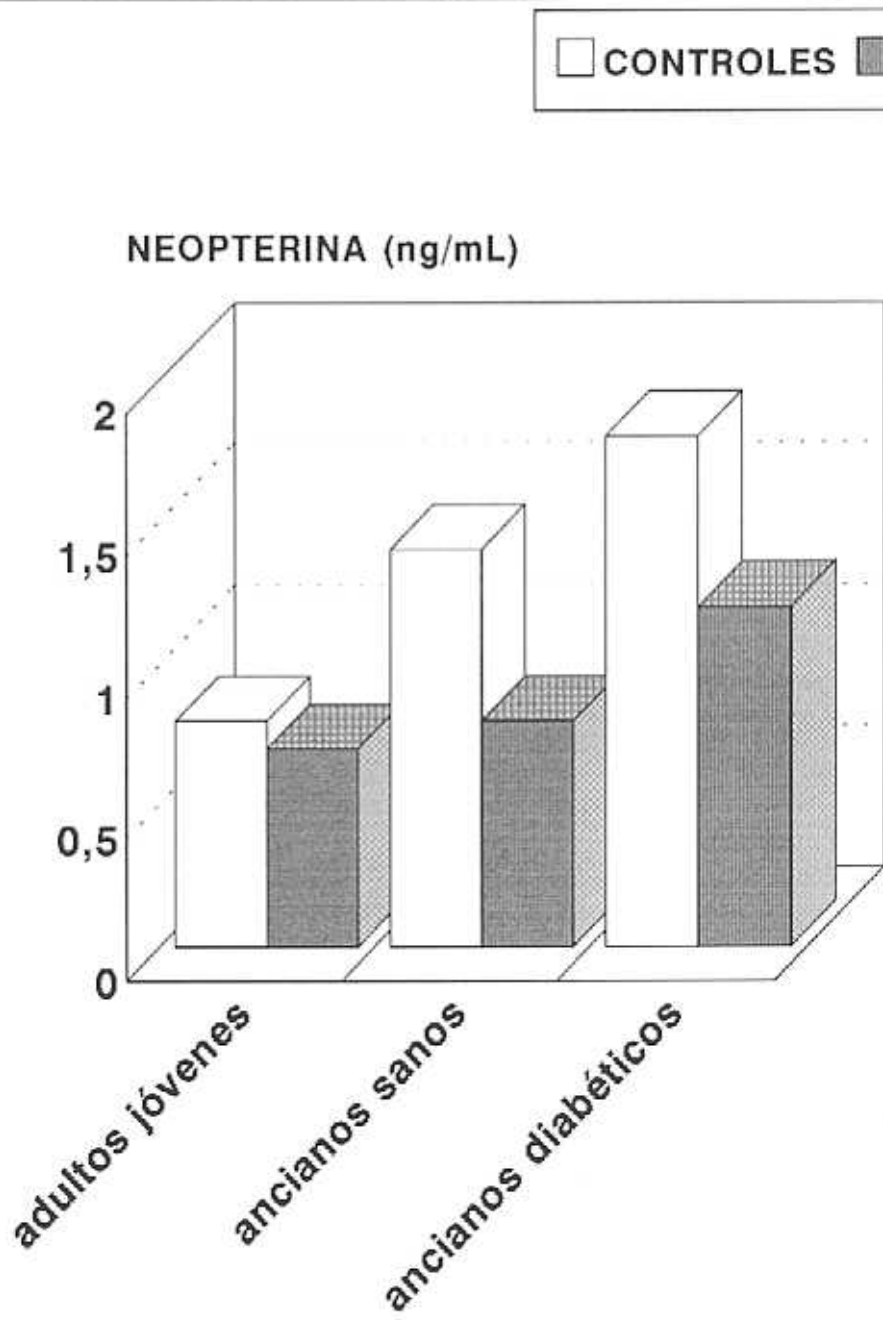
Figura 23
PRODUCCION DE NEOPTERINA EN RESPUESTA AL ESTIMULO CON SOMATOSTATINA. COMPARACION CON CONTROLES



CONTROLES	0,8 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,4
SOMATOST	7,8 ± 1,7	6,5 ± 1,4	2,5 ± 0,8

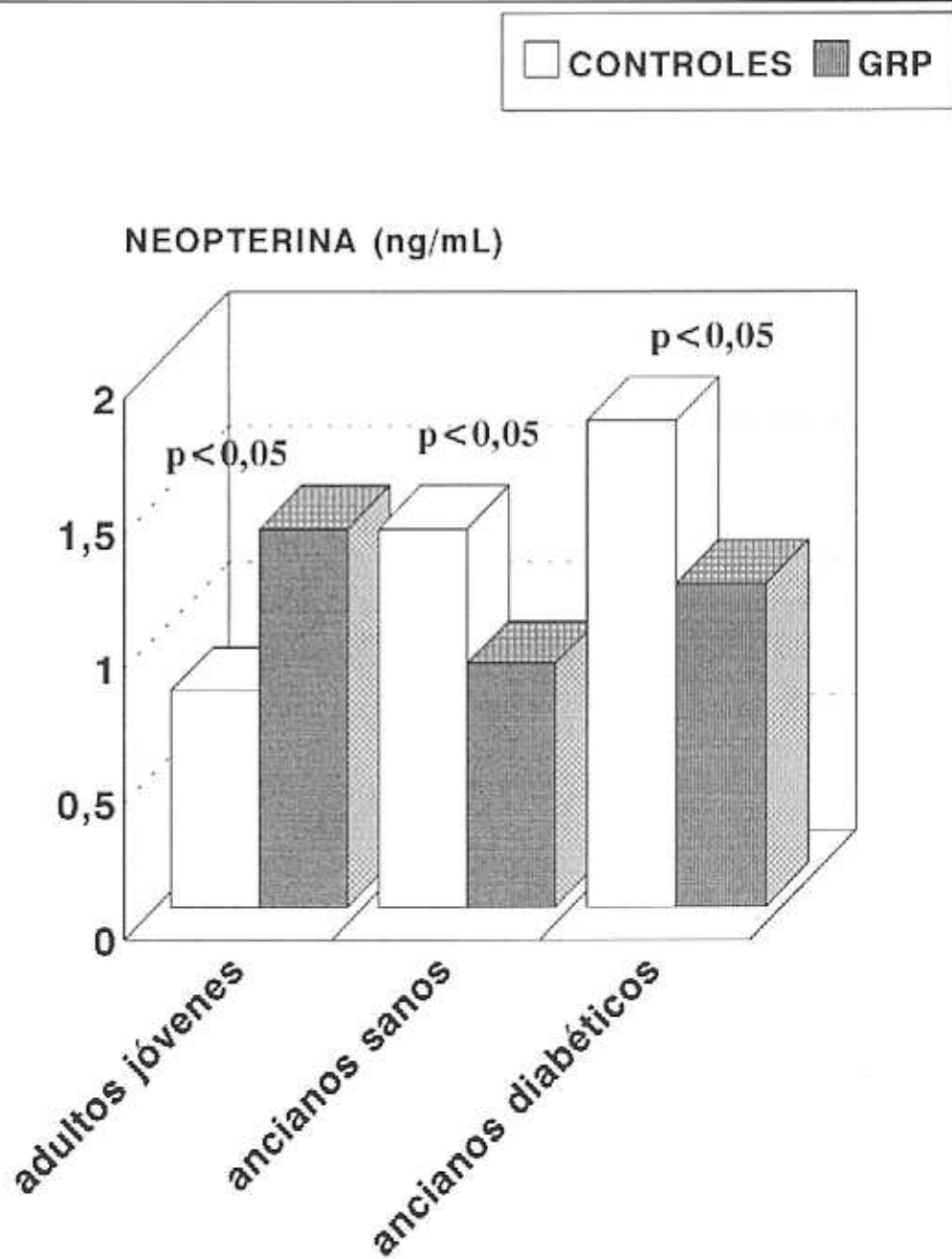
Figura 24

**PRODUCCION DE NEOPTERINA EN RESPUESTA AL ESTIMULO
CON VIP. COMPARACION CON CONTROLES**



CONTROLES	0,8±0,3	1,4±0,1	1,8±0,4
VIP	0,7±0,2	0,8±0,2	1,2±0,3

Figura 25
PRODUCCION DE NEOPTERINA EN RESPUESTA AL ESTIMULO
CON GRP. COMPARACION CON CONTROLES



CONTROLES	0,8 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,4
GRP	1,4 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,6

TABLA III
EDAD Y SEXO

	Adultos jóvenes	Ancianos sanos	Ancianos diabéticos
Pacientes (n)	10	10	10
Edad	27±2	74±6	73±9
Sexo V/M	7/3	6/4	5/5
Rango edad	25-29	68-80	62-93

TABLA IV
CARACTERISTICAS ANTROPOMETRICAS
DE LOS ANCIANOS SANOS

	Varones	Mujeres
Peso (Kg)	70,7 ± 1,5	62,6 ± 4,5
IMC (Kg m-2) *	24,9 ± 1,52	24,4 ± 1,6
ICC #	0,92 ± 0,01	0,76 ± 0,02
PCT (mm) +	22 ± 0,8	26 ± 1,0
CMB (cm) &	30,7 ± 1,5	26,3 ± 0,6
Talla (cm)	169,2 ± 2,2	160,6 ± 1,5

*IMC: índice masa corporal (rango V: 22,7-25; M: 22,4-24,5)

#ICC: índice cintura cadera (rango V: <0,95; M: <0,80)

+PCT: pliegue tricípital (rango: V: 11-22; M: 18-36)

&CMB: circunferencia media brazo (rango V: 22-31; M: 19-28 cm)

TABLA V
CARACTERISTICAS ANTROPOMETRICAS
DE LOS PACIENTES DIABETICOS

	Varones	Mujeres
Peso (Kg)	79,8±3,8	69,8±2,6
IMC (Kg m-2) *	27,7±0,2	26,6±0,4
ICC #	0,97±0,01	0,88±0,02
PCT (mm) +	26,2±1,9	36,4±0,5
CMB (cm) &	26,7±0,7	24,5±0,8
Talla (cm)	169,6±3,4	162,2±2,3

*IMC:índice masa corporal (rango V:22,7-25;M:22,4-24,5)

#ICC:índice cintura cadera (rango V:<0,95;M:<0,80)

+PCT:pliegue tricípital (rango V: 11-22;M:18-36)

&CMB:circunferencia media brazo (rango V:22-31;M:19-28 cm)

TABLA VI
DATOS BIOQUIMICOS DE
LOS ANCIANOS SANOS

	Varones	Mujeres
Albúmina (g/L)*	40±3,0	40±3,6
Transferrina (g/L) #	2,7±0,2	2,9±0,2
Zinc (μmol/L) +	18,3±2,1	19,6±1,6
Linfocitos (x10 /L) &	2050±191	2100±300
Glucosa (mmol/L) •	4,8±0,5	4,7±0,5
Insulina (pmol/L) ^	62±5	66±4

*rango: 5-50 g/L

#rango: 2,2-2,8 g/L

+rango: 10,7-22,9 μmol/L

&rango: 1500-3000 x 10 /l

•rango: 3,3-6,0 mmol/L

^rango: 58-76 pmol/L

TABLA VII
DATOS BIOQUIMICOS DE LOS
PACIENTES DIABETICOS

	Varones	Mujeres
Albúmina (g/L)*	40±12	41±11
Transferrina (g/L) #	2,4±0,1	2,5±0,2
Zinc (μmol/L) +	15,8±2,7	16,2±2,8
Linfocitos (x10 /L) &	1840±152	1950±141
Glucosa (mmol/L) •	8,2±0,7	8,2±0,6
Insulina (pmol/L) ^	122±38	129±41

*rango: 5-50 g/L

#rango: 2,2-2,8 g/L

*rango: 10,7-22,9 μmol/L

&rango: 1500-3000 x 10 /L

•rango: 3,3-6,0 mmol/L

^rango: 58-76 pmol/L

TABLA VIII
PRODUCCION ESPONTANEA DE CITOQUINAS (pg/mL)
EN LEUCOCITOS TOTALES DE SANGRE PERIFERICA

CITOQUINA	ADULTOS JOVENES	ANCIANOS SANOS	ANCIANOS DIABETICOS
IL 1-β basal	8,2±2,3	5,8±1,1*	7,4±2,1
IL-1β control	88±44 +	82±51 +	97±38 +
IL-6 basal	3,4±98	4,9±1,3	3,7±0,6
IL-6 control	198±107 +	193±113 +	196±143 +
TNF-alfa basal	9,3±6,2	31±13,9 *#	7,3±1,8
TNF-alfa control	672±219 +	513±266 +	722±205 +

*p<0,05 respecto a adultos jóvenes

#p<0,05 respecto a ancianos diabéticos

+p<0,05 respecto a muestras basales

TABLA IX
PRODUCCION DE IL-1 β (pg/mL) EN RESPUESTA
AL ESTIMULO CON LPS Y DIVERSOS NEUROPEPTIDOS

ESTIMULO	ADULTOS JOVENES	ANCIANOS SANOS	ANCIANOS DIABETICOS
CONTROLES	88 \pm 44	82 \pm 51	97 \pm 38
LPS	1711 \pm 786 +++	2490 \pm 905 *#+++	1154 \pm 451 +++
NPY	151 \pm 69 +	188 \pm 71 #+	168 \pm 36 +
SOMATOSTATINA	171 \pm 51 +	175 \pm 97 +	138 \pm 58
VIP	345 \pm 142 +++	308 \pm 75 #+++	133 \pm 58 *++
GRP	87 \pm 25	407 \pm 25 ***++	303 \pm 10 *++

*p<0,05, ***p<0,001 respecto a adultos jóvenes

#p<0,05, respecto a ancianos diabéticos

+p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001 respecto a sus muestras controles

TABLA X
PRODUCCION DE IL-6 (pg/mL) EN RESPUESTA
AL ESTIMULO CON LPS Y DIVERSOS NEUROPEPTIDOS

ESTIMULO	ADULTOS JOVENES	ANCIANOS SANOS	ANCIANOS DIABETICOS
CONTROLES	198±107	193±113	196±143
LPS	711±268 +++	598±241 +++	476±152 +++
NPY	307±109 +	169±68 *	227±41
SOMATOSTATINA	155±45	221±77	267±78
VIP	379±102 ++	498±133 *#++	1161±74 **+++
GRP	313±58 +	1766±12 ***#++	1246±168 ***+++

*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001 respecto a adultos jóvenes

#p<0,05,##p<0,01 respecto a ancianos diabéticos

+p<0,05,++p<0,01,+++p<0,001 respecto a sus muestras controles

TABLA XI
PRODUCCION DE TNF-alfa (pg/mL) EN RESPUESTA
AL ESTIMULO CON LPS Y DIVERSOS NEUROPEPTIDOS

ESTIMULO	ADULTOS JOVENES	ANCIANOS SANOS	ANCIANOS DIABETICOS
CONTROLES	672±219	593±266	722±205
LPS	4576±1666 +++	3792±1136 +++	2964±1651 +++
NPY	1293±419 +++	1404±603 +++	1443±675 +++
SOMATOSTATINA	1176±351 ++	1279±451 ++	1300±458 ++
VIP	723±209	954±215 *#++	674±188
GRP	116±31 +++	691±46 ***##	1090±77 ***##

*p<0,05, ***p<0,001 respecto a adultos jóvenes

#p<0,05, ##p<0,01 respecto a ancianos diabéticos

++p<0,01, +++p<0,001 respecto a sus muestras controles

TABLA XII
PRODUCCION DE IL-1 β (pg/mL) EN RESPUESTA AL
ESTIMULO COMBINADO DE LPS Y DIVERSOS NEUROPEPTIDOS

ESTIMULO	ADULTOS JOVENES	ANCIANOS SANOS	ANCIANOS DIABETICOS
LPS	1711 \pm 786	2490 \pm 905 *#	1154 \pm 451
LPS+NPY	2457 \pm 940 ++	2194 \pm 802	1363 \pm 614 *
LPS+SOMAT	2109 \pm 804	2079 \pm 717	1219 \pm 478 *
LPS+VIP	2153 \pm 905	1813 \pm 371 #	1146 \pm 211 *
LPS+GRP	1810 \pm 152	3084 \pm 283 ***###	1984 \pm 211

*p<0,05,***p<0,001 respecto a adultos jóvenes

#p<0,05,### p<0,001 respecto a ancianos diabéticos

++ p<0,01, respectoa su LPS

TABLA XIII
PRODUCCION DE IL-6 (pg/mL) EN RESPUESTA AL
ESTIMULO COMBINADO DE LPS Y DIVERSOS NEUROPEPTIDOS

ESTIMULO	ADULTOS JOVENES	ANCIANOS SANOS	ANCIANOS DIABETICOS
LPS	711±268	598±241	476±152
LPS+NPY	720±289	406±163 *#	263±103 *+
LPS+SOMAT	761±298	568±172 *	478±138 *
LPS+VIP	2756±658 +++	9198±1163 ***###+++	1716±365*+++
LPS+GRP	943±121	4876±765 ***+++	4133±684 ***+++

*p<0,05,***p<0,001 respecto a adultos jóvenes
p<0,001 respecto a ancianos diabéticos
+ p<0,05, +++ p<0,001 respecto a su LPS

TABLA XIV
PRODUCCION DE TNF-alfa (pg/mL) EN RESPUESTA AL
ESTIMULO COMBINADO DE LPS Y DIVERSOS NEUROPEPTIDOS

ESTIMULO	ADULTOS JOVENES	ANCIANOS SANOS	ANCIANOS DIABETICOS
LPS	4576±1666	3792±1136	2964±1651
LPS+NPY	4155±1805	3918±1639	3893±1082
LPS+SOMAT	4280±1640	3178±1113	3727±1024
LPS+VIP	2687±971 +++	3747±1539	2678±1435
LPS+GRP	1113±165 +++	3494±611 ***##	4369±316 ***++

***p<0,001 respecto a adultos jóvenes

p<0,05 respecto a ancianos diabéticos

++ p<0,01, +++ p<0,001 respectoa su LPS

TABLA XV
PRODUCCION DE IL-1 β (pg/mL) TRAS 4 HORAS DE ESTIMULACION CON DIFERENTES NEUROPEPTIDOS Y LPS

ESTIMULO	ADULTOS JOVENES	ANCIANOS SANOS	ANCIANOS DIABETICOS
CONTROLES	88 \pm 44	88 \pm 51	97 \pm 38
NPY	151 \pm 69 +	188 \pm 71 #+	162 \pm 36 +
SOMATOSTATINA	171 \pm 51 +	175 \pm 97 +	138 \pm 58
VIP	345 \pm 142 +++	308 \pm 75 #+++	133 \pm 58 *
GRP	87 \pm 25	407 \pm 25 ***++	303 \pm 10 *++
LPS	1711 \pm 786 +++	2490 \pm 905 *#+++	1154 \pm 451 +++
LPS + NPY	2457 \pm 940 +++a	2194 \pm 802 +++	1363 \pm 614 *+++
LPS + SOMATOST	2109 \pm 804 +++	2079 \pm 717 +++	1219 \pm 478 *+++
LPS + VIP	2153 \pm 905 +++	1831 \pm 371 #+++	1146 \pm 211 *+++
LPS + GRP	1810 \pm 152 +++	3084 \pm 283 ***###+++	1984 \pm 211 +++

*p<0,05,***p<0,001 respecto a adultos jóvenes

#p<0,05,###p<0,001 respecto a ancianos diabéticos

+p<0,05,++p<0,01,+++p<0,001 respecto a sus muestras controles

a p<0,01 respecto a su LPS

TABLA XVI
PRODUCCION DE IL-6 (pg/mL) TRAS 4 HORAS DE ESTIMULACION CON DIFERENTES NEUROPEPTIDOS Y LPS

ESTIMULO	ADULTOS JOVENES	ANCIANOS SANOS	ANCIANOS DIABETICOS
CONTROLES	198±107	193±113	196±143
NPY	307±109+	169±68*	227±41
SOMATOSTATINA	155±45	221±77	267±78
VIP	379±102 ++	498±133*##++	1161±74 **+++
GRP	313±58 +	1766±12 ***#+++	1246±168 ***+++
LPS	711±268 +++	598±241 *#+++	476±152 +++
LPS + NPY	720±289 +++	406±163 *#+++	256±103 *+a
LPS + SOMATOST	761±298 +++	568±172 *+++	478±138 *+++
LPS + VIP	2756±658 +++b	9198±1163 ***##b+++	1716±365 *b+++
LPS + GRP	943±121 +++	4876±765 ***b+++	4133±684 ***b+++

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 respecto a adultos jóvenes
 #p<0,05, ###p<0,001 respecto a ancianos diabéticos
 +p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001 respecto a sus muestras controles
 a p<0,01, b p<0,001 respecto a su LPS

TABLA XVII
PRODUCCION DE TNF-alfa (pg/mL) TRAS 4 HORAS DE ESTIMULACION CON DIFERENTES NEUROPEPTIDOS Y LPS

ESTIMULO	ADULTOS JOVENES	ANCIANOS SANOS	ANCIANOS DIABETICOS
CONTROLES	672±219	513±266	722±205
NPY	1293±419+++	1404±603 +++	1443±675 +++
SOMATOSTATINA	1176±351 ++	1279±451 ++	1300±458 ++
VIP	723±209	954±215 *#++	674±188
GRP	116±31 +++	691±46 ***##	1090±77 ***++
LPS	4576±1666 +++	3792±1136 +++	2964±1651 +++
LPS + NPY	4155±1805 +++	3918±1639 +++	3893±1082 +++
LPS + SOMATOST	4280±1640 +++	3178±1113 +++	3727±1024 +++
LPS + VIP	2687±971 b+++	3747±1539 +++	2678±1435 +++
LPS + GRP	1113±165 b++	3494±611 ***##+++	4369±316 ***a+++

*p<0,05,***p<0,001 respecto a adultos jóvenes

##p<0,01 respecto a ancianos diabéticos

++p<0,01,+++p<0,001 respecto a sus muestras controles

a p<0,01,b p<0,001 respecto a su LPS

TABLA XVIII

**PRODUCCION DE LB4 (ng/mL) EN MUESTRAS BASALES,
CONTROLES Y EN RESPUESTA A LA ESTIMULACION
CON LPS, NPY, SOMATOSTATINA, VIP Y GRP**

ESTIMULO	ADULTOS JOVENES	ANCIANOS SANOS	ANCIANOS DIABETICOS
BASALES	8,2±1,1	12,4±1,4*	12,5±1,6*
CONTROLES	6,2±1,2	7,1±2,3	9,4±0,5*
LPS	25,9±4,8+++	30,5±2,5###+++	41±6,6+++**
NPY	6,7±0,9	7,9±1,3	9,1±2,3
SOMATOSTATINA	4,1±1,5	3,7±1,6##+	7,8±2,2*
VIP	4,8±1,6	5,3±0,6#	9,3±0,7*
GRP	5,1±2,6	6,7±2,4	9,8±0,5*

*p<0,05 respecto a adultos jóvenes

#p<0,05 ##p<0,01 respecto a ancianos diabéticos

+p<0,05; ++p<0,01; +++p<0,001 respecto a sus controles

TABLA XIX

**PRODUCCION DE NEOPTERINA (ng/mL) EN MUESTRAS
BASALES, CONTROLES Y EN RESPUESTA A LA ESTIMULACION
CON LPS, NPY, SOMATOSTATINA, VIP Y GRP**

ESTIMULO	ADULTOS JOVENES	ANCIANOS SANOS	ANCIANOS DIABETICOS
BASALES	1,0±0,2	2,9±0,7	3,2±0,6*
CONTROLES	0,8±0,3	1,4±0,1	1,8±0,4*
LPS	0,5±0,2	1,2±0,1	2,1±0,3*
NPY	0,9±0,2	2,2±0,6+###*	3,9±0,4+++***
SOMATOSTATINA	7,8±1,7+++	6,5±1,4###+++	2,5±0,8***
VIP	0,7±0,2	0,8±0,2	1,2±0,3*
GRP	1,4±0,3+	0,9±0,2*	1,2±0,6+

*p<0,05,***p<0,001 respecto a adultos jóvenes

#p<0,05;##p<0,01;###p<0,001 respecto a ancianos diabéticos

+p<0,05; ++p<0,01; +++p<0,001 respecto a sus controles

DISCUSSION

El conocimiento de que las citoquinas pueden modular muchos aspectos de la respuesta inmune, nos ha llevado a estudiar el efecto que diversos neuropéptidos podrían ejercer sobre su síntesis y liberación. Por otra parte, se sabe que tanto el envejecimiento como determinadas enfermedades se asocian a una disminución de la respuesta inmune, más aún, algunos autores han propuesto que algunas de las alteraciones asociadas al proceso fisiológico de envejecimiento podrían deberse a una alteración de las interacciones entre el sistema nervioso y el sistema inmune.

La producción de citoquinas en respuesta a los neuropéptidos que se estudian en este trabajo (neuropéptido Y, somatostatina, péptido intestinal vasoactivo, péptido liberador de gastrina), así como su variación con la edad y la enfermedad no han sido investigados en humanos. Tampoco ha sido estudiada en el hombre la acción de estos neuropéptidos sobre la síntesis de citoquinas inducida por LPS ni sobre la síntesis de otros mediadores de la respuesta inflamatoria, como el leucotrieno B₄ y la neopterinina.

Para estudiar la capacidad de los leucocitos de sangre periférica de producir citoquinas, seguimos el método descrito por De Groote et al. (1992), con algunas modificaciones. Generalmente, las células utilizadas para la estimulación con diversos mitógenos con el fin de producir citoquinas, han sido células mononucleares aisladas de sangre periférica o de diversos fluidos, como el líquido sinovial. Este procedimiento elimina las células polimorfonucleares que representan un 60% de los leucocitos y juegan un importante papel en las comunicaciones intercelulares que regulan la liberación de citoquinas, siendo activados por citoquinas tales como el IFN-

gamma y TNF-alfa y con la capacidad de sintetizar también TNF-alfa (Dubravec et al., 1990; Djeu et al., 1990; Bellanti, 1994; Thiel y Chouker, 1995), interleuquina-1 alfa e interleuquina-1 β (Marucha et al., 1990; Lord et al., 1991).

Además los métodos que separan células mononucleares de sangre periférica modifican los ratios linfocitos/monocitos, de tal forma que las concentraciones de monocitos son significativamente reducidas lo cual puede ser debido a la adsorción de los monocitos a diferentes estructuras utilizadas durante la separación, como por ejemplo el vidrio o geles. Esta alteración en los índices monocitos/linfocitos en células mononucleares aisladas puede afectar de forma cualitativa y cuantitativa la producción de citoquinas. Bajo estas circunstancias, la respuesta de los monocitos in vitro puede no representar totalmente lo que ocurre in vivo, ya que las células mononucleares se afectarían por los procesos de purificación (Allen et al., 1992).

Otros autores han aislado y cultivado en medios sintéticos células polimorfonucleares con el mismo objetivo, aunque los resultados también reflejan inexactitud y baja reproductibilidad (Van Der Meer, 1988; Reuter et al., 1988; Bernier et al., 1989).

Por otra parte, la estimulación de una sola población de células blancas elimina la influencia de otras citoquinas producidas, en mayor o menor cantidad, por otras poblaciones de células blancas, así como de otros factores, tanto estimuladores como inhibidores, normalmente presentes en sangre periférica y que presentan una participación activa en la regulación del

sistema inmune. La utilización de sangre total preserva todas las interacciones que ocurren de forma natural, así como el mantenimiento de las concentraciones habituales de los mediadores estimuladores e inhibidores circulantes.

Por todo ello, la sangre total parece ser el medio más apropiado para estudiar la producción de citoquinas in vitro. Algunos autores han utilizado sangre total para estudiar la producción de citoquinas activadas policlonalmente. Así, Desch et al. (1990) estudian la liberación de TNF-alfa, Deforge y Remick (1991) investigan la síntesis de TNF-alfa, IL-6 e IL-8 y Allen et al. (1995) la producción de IL-1 β y TNF-alfa. Además, estos estudios comparan sangre total no diluída y sangre total diluída en medio de cultivo, siendo esta última opción la más adecuada para estudiar la producción de citoquinas in vitro. Esto es debido a que la sangre total diluída en un medio de cultivo adecuado, puede reproducir las condiciones fisiológicas donde ocurren interacciones inmunes in vivo humorales y celulares, por lo que puede usarse para el estudio de la producción de citoquinas in vitro y de la modulación de esta producción por factores endógenos y exógenos (De Groot et al., 1992).

Otra ventaja de la sangre total diluída es su mayor estabilidad a largo plazo frente a la no diluída. Aunque la conveniencia de diluir la sangre total es aceptada por muchos autores, los volúmenes de dilución varían en los artículos revisados, dependiendo en cierta medida de la citoquina a medir. Lyte en un trabajo publicado en 1987 sugiere que la síntesis y cuantificación de IL-1 β e IL-2 es posible en sangre total diluída a 1/5, mientras que Krichner et al. (1982) y Ellaurie et al. (1991) concluyen que la síntesis de interferon-

gamma ocurre cuando la dilución es efectuada a 1/10 y en respuesta a diferentes activadores policlonales y antígenos específicos, respectivamente.

En relación a la respuesta a los distintos activadores policlonales, y tanto en sangre total como en células mononucleares de sangre periférica, el lipopolisacárido (LPS) parece ser el antígeno más adecuado para estimular la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF-alfa y ejercer su estímulo rápidamente (entre 1 y 4 horas). Este espacio de tiempo sería suficiente para que el activador produzca la expresión del RNAm de esas citoquinas, seguida de la secreción de aquellas. El reconocimiento del LPS por receptores específicos situados en la membrana de monocitos, macrófagos y neutrófilos parece iniciar la respuesta celular al activador (Morrison et al., 1993; Ulevitch, 1993). La proteína de membrana CD14, juega un papel fundamental en el reconocimiento celular del LPS y, se cree que, junto con la LPS-binding protein forman parte de un complejo receptor del LPS funcionalmente ligado al comienzo de sucesos asociados a la activación celular que induce el LPS (Schumann et al., 1990; Tobías y Ulevitch, 1993; Ulevitch y Tobías, 1994).

Respecto a la concentración idónea del LPS para que se estimule la síntesis de citoquinas, las investigaciones de Allen et al. (1992) demuestran que concentraciones tan bajas como 1 pg de LPS/mL de sangre total potencian la síntesis de IL-1 β y sus niveles pueden ser detectados por enzimoimmunoensayo (ELISA). Estos hallazgos corroboran otros trabajos en los que cultivos de sangre total se utilizaron para estudiar la liberación de diversos péptidos inflamatorios como son TNF-alfa (Desch et al., 1990; Strieter et al., 1990; Kulseng et al., 1996), IL-6 (Kato et al., 1990) e interferon (Kirchner, 1982). De Groote et al. (1992) y Cassatella (1995) sugieren que a

5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF-alfa alcanzan niveles que reflejan el estado del sistema inmune, aunque sería a 25 $\mu\text{g/mL}$ de LPS cuando se potenciaría la síntesis rápida (entre 1 y 4 horas) de citoquinas. En nuestro estudio la concentración de LPS utilizada fué 25 $\mu\text{g/mL}$, cantidad suficiente para la potenciación de la síntesis de citoquinas tras un tiempo de incubación de 4 horas a 37°C. Con esta concentración y este tiempo de incubación se logran niveles perfectamente detectables con los enzimoimmunoensayos disponibles comercialmente. A la vez, y como demostramos en los resultados expuestos, las 4 horas de incubación son también suficientes para que los neuropéptidos investigados estimulen la producción de citoquinas.

5.1. PAPEL MODULADOR DE LOS NEUROPEPTIDOS EN LA PRODUCCION DE CITOQUINAS

En 1988, Lotz et al. investigaron la capacidad de los neuropéptidos sustancia P y sustancia K de regular la producción de citoquinas por monocitos de sangre humana, concluyendo que ambos neuropéptidos son potentes y específicos estímulos de la síntesis de IL-1, IL-6 y TNF-alfa. Este es el primer trabajo que investiga el aspecto regulador de los neuropéptidos a cerca de la respuesta inmune en humanos. Posteriormente se han realizado otros estudios, aunque en la literatura consultada no hemos encontrado datos a cerca del papel regulador de los neuropéptidos revisados en esta tesis: neuropéptido Y, somatostatina, péptido intestinal vasoactivo y péptido liberador de gastrina.

Lotz et al. (1988) observaron que la sustancia P y su análogo sustancia K inducen la liberación de estas citoquinas por monocitos humanos a una concentración de 10^{-7} M a partir de 6 horas de incubación con los neuropéptidos. Otros investigadores también demostraron este efecto en líneas celulares monocíticas procedentes de ratones (Kimball et al., 1988; Rameshwar, 1992) o en monocitos humanos activados con lipopolisacárido (Laurenzi et al., 1990). En experimentos posteriores se observó que la sustancia P originaba, a concentraciones consideradas fisiológicas (10^{-12} M de sustancia P), un aumento en la expresión de la IL-2 en células T humanas activadas, tanto en sangre como en otros órganos (Calvo et al., 1992).

Este efecto sobre la producción de IL-1 también ha sido objeto de estudio con los neuropéptidos neurotensina y bombesina. A cerca de la acción moduladora de la neurotensina, Lemaire (1988) observó una acción potenciadora sobre la producción de IL-1 cuando los macrófagos alveolares activados (activados con lipopolisacárido, zymosan, muramil-dipéptido) de rata eran incubados con neurotensina a concentraciones entre 10^{-11} M a 10^{-6} M. Con relación a la bombesina y sus análogos GRP y neuromedina C, otros autores (Ruff, 1985; Jin et al., 1990; del Río et al., 1994) observaron un incremento en la síntesis de IL-1 β cuando macrófagos peritoneales murinos eran incubados con esos neuropéptidos a concentraciones de 10^{-9} M para la bombesina y 10^{-11} M para la neuromedina C. Así mismo, este incremento no se observó cuando las células eran incubadas con los neuropéptidos y el mitógeno Con A.

5.1.1. PAPEL MODULADOR DEL NPY

En relación al NPY se conoce, en seres humanos, que tras un ejercicio físico intenso, insuficiencia cardíaca o hipertensión arterial aguda, se activa

el sistema simpático-adrenal experimentando el neuropéptido Y un incremento paralelo al de las catecolaminas. Esta elevación plasmática se correlaciona con una elevada concentración en los tejidos linfoides (Solt et al., 1990).

El papel regulador del NPY sobre la producción de citoquinas, no está citado en la literatura. Existen estudios a cerca de su acción sobre la proliferación linfocitaria, con frecuencia en diferentes sistemas, tipos celulares, especies y/o dosis diferentes. En algunos casos los efectos del NPY han sido obtenidos a dosis no fisiológicas, por lo que su aplicación in vivo no resulta muy eficaz.

Johanson y Sandberg (1988) estudiaron el efecto del NPY sobre la proliferación linfocitaria en un amplio margen de concentraciones, y comprobaron que no poseía actividad proliferativa en presencia o ausencia de un mitógeno. Irwin et al. (1991) investigaron la posible relación entre el NPY y la actividad de las células "natural killer" en pacientes con depresión y enfermedad de Alzheimer. Sus resultados sugieren que el aumento de la actividad del sistema nervioso simpático y la liberación de NPY, pueden asociarse a la modulación de la citotoxicidad de las células "natural killer". Por otra parte parece que el NPY puede estimular las funciones de los macrófagos, en el sentido de ejercer una modulación positiva de ellas, aunque sólomente se ha comprobado en macrófagos murinos a través de un mecanismo mediado por la protein kinasa C (De la Fuente et al., 1993a).

Nuestros resultados muestran que el NPY potencia la síntesis de IL-1 β de forma significativa (Figura 8), aunque en menor proporción que el LPS (Tabla XVII). Este efecto favorecedor de la producción de IL-1 β del NPY

parece sumarse al efecto estimulador del activador policlonal, en el caso de los adultos jóvenes y no siendo así en la población anciana (Tabla XVII). Con respecto a las otras dos citoquinas investigadas, el NPY potencia la síntesis de IL-6 en los adultos jóvenes y de TNF-alfa tanto en los jóvenes como en los ancianos (Tabla XII).

5.1.2. PAPEL MODULADOR DE LA SOMATOSTATINA

La existencia de receptores al neuropéptido somatostatina, tanto en linfocitos como en monocitos, ha sido demostrado por diversos autores (Payan y Goetzi, 1985; Morley et al., 1987) y su acción moduladora sobre el sistema inmune está siendo investigada. Se sabe que su función sobre el sistema inmune parece ser principalmente inhibidora, así como estabilizadora de las reacciones inmunes (Payan y Goetzi, 1985). La somatostatina inhibe la síntesis de DNA inducida por el mitógeno Con A en los timocitos de rata (Mascardo, 1984) y en los linfocitos de ratón (Stanisz et al., 1986; Stanisz et al., 1987). También inhibe los linfoblastos Molt-4, linfocitos T humanos estimulados con PHA (Payan et al., 1984) y cultivos de linfocitos mezclados en células de ganglios linfáticos de ratón (Krcso et al., 1986).

Sin embargo otros autores le reconocen a la somatostatina una función estimuladora de la función inmune. Pawlikowski et al., (1985) demostraron que la somatostatina a una concentración de 10^{-7} M incrementa la proliferación espontánea de linfocitos procedentes del bazo de ratones, mientras que a concentraciones entre 10^{-9} M y 10^{-8} M la inhibe. Nordlind y Mutt (1986a y b) demostraron que estimulaba la incorporación de timidina a los linfocitos T humanos estimulados con cloruro de mercurio o níquel. Johansson y Sandberg (1989) también demostraron una ligera función estimuladora del

neuropéptido sobre los timocitos de cerdos guineanos a una concentración de 10^{-6} M. Lotz et al. (1988) encontraron una estimulación de la proliferación de los linfocitos T humanos, así como la potenciación de la liberación de IL-1 por monocitos humanos, aunque también una inhibición de la proliferación inducida por Con A de linfocitos de timo, bazo y ganglios linfáticos axilares.

En este estudio observamos que la somatostatina a concentraciones fisiológicas (10^{-10} M) incrementa la producción de IL- 1β y TNF-alfa en leucocitos de sangre periférica humanos tanto en adultos jóvenes como en ancianos sanos y ancianos diabéticos (Tablas IX y XI; figuras 5 y 13). Por otra parte el efecto estimulador sobre la producción de citoquinas del LPS, no se potencia cuando añadimos somatostatina a las células de sangre total en cualquier grupo de sujetos (Tablas XII, XIII y XIV).

5.1.3. PAPEL MODULADOR DEL VIP

Otro de los neuropéptidos investigados en este estudio es el VIP. En la introducción de esta tesis se citan varios experimentos que demuestran la función moduladora que ejerce el VIP entre los sistemas nervioso e inmune. También existe controversia a cerca de si el VIP es estimulador o inhibidor de las funciones inmunes. Ottaway (1987) apoya un efecto inhibidor sobre la proliferación linfocitaria y sobre la producción de IL-2, al igual que Krco et al. (1986) que demuestra esta inhibición sobre cultivos de linfocitos mezclados (MLC) y Stanislz (1986) que observa una inhibición de la proliferación inducida por el mitógeno Con A de células de ratón de ganglios linfáticos, bazo y placas de Peyer. Sin embargo Sher et al. (1990) demostraron que el granuloma de células T podría liberar IL-5 en respuesta al estímulo de diferentes antígenos y mitógenos, y Mathew et al. (1992) corroboraron estos

datos al demostrar que el VIP puede activar la secreción de IL-5 en granulomas de células T y en linfocitos T esplénicos a concentraciones tan bajas (10^{-8} M). Ganea y Sun (1993) observaron que el VIP inhibe la producción de IL-2 en esplenocitos murinos y en células T CD4+ purificadas, mientras que no afecta a la producción de IFN-gamma en esplenocitos y diversas líneas celulares murinas.

Nuestro trabajo apoya la existencia de un efecto estimulador del VIP, ya que a concentraciones fisiológicas (10^{-9} M) aumenta, en general, la secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF-alfa por leucocitos de sangre periférica en los tres grupos estudiados (Tablas IX, X y XI). Además, este efecto es más llamativo con la IL-6 en el grupo de los pacientes diabéticos (Figura 10). El VIP no modificó la síntesis de IL-1 β inducida por el LPS en los tres grupos del estudio (Tabla XII), ni tampoco TNF-alfa en los ancianos sanos y ancianos diabéticos (Tabla XIV). Sobre la síntesis de IL-6 por células estimuladas con LPS, el VIP ejerció un efecto potenciador especialmente en el grupo de ancianos (Tabla XIII).

Algunos autores explican este efecto inhibitor debido a que puede elevar la concentración de AMPc intracelular, tras ligarse el neuropéptido a su receptor celular y activar la adenilato-ciclasa. Esta acción ha sido demostrada en diversos tipos de células, incluyendo células mononucleares de sangre periférica humana, líneas celulares linfoblásticas humanas (MOLT-4b y SUP-T1), linfocitos B humanos y macrófagos peritoneales de rata (O'Dorisio et al. 1981, 1985 y 1989; Beed et al., 1983; Robberecht et al., 1989; Weinstock et al., 1991; Segura et al., 1992). Por el contrario, el efecto estimulador del VIP parece más difícil de explicar, sobre todo si aceptamos la idea de la activación

de la vía adenilato-ciclasa. Podría ocurrir, como en el caso de la liberación de IL-5 en células de granuloma mansoni (Mathew et al., 1992) que el VIP liberado por los eosinófilos podría interactuar con los receptores VIP de los linfocitos y modular la producción de IL-5 como parte de un circuito regulador feed-back.

5.1.4. PAPEL MODULADOR DEL GRP

La existencia de esta conexión funcional entre el sistema nervioso y el sistema inmune, también es apoyada por la acción de otros neuropéptidos como el GRP sobre la producción de mediadores inmunes. La bombesina y sus análogos péptido liberador de gastrina y neuromedina C son una familia de péptidos que se encuentran en el SNC y SNP, así como en el tracto gastro-intestinal de mamíferos.

Estudios in vitro han demostrado que son reguladores de las funciones inmunes. Sin embargo, la acción del GRP sobre la producción de las citoquinas prácticamente no se ha investigado. Fink et al. (1988) sugieren que tanto la bombesina como el GRP pueden inhibir la proliferación de células CTLL-2 inducida por la IL-2, estando este efecto mediado por un receptor específico para esos neuropéptidos en las células CTLL-2. Otros autores demuestran que producen un aumento importante de la secreción de IgA e IgG en células intestinales de rata (Jin et al., 1989) y aumentan ligeramente la respuesta proliferativa inducida por aloantrígenos en el ratón (Krcó et al., 1986). Del Río et al. (1994) han investigado a cerca de su papel estimulador de la síntesis de IL-1 β y han encontrado que un incremento en la producción de esta citoquina en cultivos de macrófagos peritoneales de ratón incubados con bombesina, GRP y neuromedina C. Sin embargo, la síntesis de IL-1 β

inducida por el mitógeno Con A disminuyó al incubar las células con los neuropéptidos.

Por otra parte, también se ha demostrado que esta familia de neuropéptidos pueden estimular las diversas funciones de los macrófagos, y que estas células serían necesarias para que estos neuropéptidos actuaran sobre los linfocitos (Johansson y Sandberg, 1989; Jin et al., 1990; De la Fuente et al., 1991; Del Río y De la Fuente, 1994).

En nuestro trabajo hemos encontrado un incremento de la síntesis de IL-1 β , IL-6 en toda la población del estudio y de TNF-alfa en la población anciana, así como una importante disminución de la producción de TNF-alfa en los adultos jóvenes cuando incubamos los leucocitos de sangre periférica con GRP (Tablas XV, XVI y XVII).

Cuando añadimos GRP a las muestras previamente estimuladas con LPS, la síntesis de IL-6 aumentó significativamente ($p < 0,001$) en los ancianos sanos y diabéticos (Tabla XIII), mientras que la producción de IL-1 β no sufrió modificaciones (Tabla XII). Sin embargo, es importante destacar el efecto del GRP sobre el TNF-alfa en los adultos jóvenes, ya que el neuropéptido inhibió la síntesis de TNF-alfa (Tabla XI). Esta acción inhibitoria del GRP sobre la síntesis de TNF-alfa y sobre la síntesis de TNF-alfa inducida por LPS en adultos jóvenes nos sugiere un efecto protector y modulador del neuropéptido sobre los mecanismos de envejecimiento fisiológicos, así como en una ruptura de la conexión entre sistema nervioso y sistema inmune en los individuos ancianos.

Los resultados encontrados en este trabajo demuestran que el neuropéptido Y, somatostatina, péptido intestinal vasoactivo y péptido liberador de gastrina a concentraciones fisiológicas aumentan, en general, la producción in vitro de IL-1 β , IL-6 y TNF-alfa por leucocitos humanos de sangre periférica en adultos jóvenes, ancianos sanos y ancianos diabéticos. Estos hallazgos corroboran la idea de una íntima relación entre sistema nervioso y sistema inmune. Además, estos neuropéptidos pueden modular in vivo la producción de citoquinas inducida por activadores policlonales tales como el lipopolisacárido.

5.2. PAPEL MODULADOR DE LOS NEUROPEPTIDOS EN LA SINTESIS DE LEUCOTRIENO B4 Y NEOPTERINA.

Los neuropéptidos juegan un importante papel en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria, por lo que creímos conveniente investigar la respuesta de otros mediadores inflamatorios como el **leucotrieno B4** y la neopterina tras el estímulo con neuropéptido Y, somatostatina, péptido intestinal vasoactivo y péptido liberador de gastrina.

Existen algunos estudios que investigan la función de los neuropéptidos en la inflamación, concretamente sobre la función quimiotáctica de los eosinófilos. Numao y Agrawal (1992) examinaron el efecto de la sustancia P, neurokinina A, péptido relacionado con el gen de la calcitonina y colecistoquinina y demostraron que no ejercían ninguna acción quimiotáctica. Sin embargo, si estimulaban la quimiotaxis inducida por el leucotrieno B4 y por el factor activador de plaquetas (PAF). También se ha visto que la

neurotensina podría aumentar la biodisponibilidad del ácido araquidónico para que actúe la lipooxigenasa, estimulando la producción de, entre otros compuestos, leucotrieno B4 (Liles et al., 1987; Kroegel et al., 1990).

En nuestro estudio observamos que los neuropéptidos investigados no modificaban, en general, la producción de leucotrieno B4, salvo la somatostatina (Tabla XVIII). Por otra parte cuando incubamos las células con lipopolisacárido, la síntesis de leucotrieno B4 se incrementó en toda la población del estudio (Figura 16). Aunque no de forma significativa, tras incubar las células con somatostatina, VIP y GRP la síntesis de leucotrieno B4 mostró una ligera tendencia a disminuir en todos los grupos. Además, en el grupo de ancianos sanos la somatostatina produjo una disminución estadísticamente significativa del leucotrieno B4.

Estos resultados concuerdan en parte con los estudios citados y apoyan la idea de que los neuropéptidos por si solos no estimulan la síntesis de leucotrieno B4.

Se sabe que la **neopterina** es un marcador de la actividad metabólica del sistema monocito-macrófago (Fusch et al., 1988), siendo el interferón-gamma el inductor más potente in vitro de su formación y liberación por los monocitos y macrófagos humanos (Werner et al., 1990; Samsonov et al., 1996), mientras que el factor de necrosis tumoral y el lipopolisacárido potencian los efectos del interferon-gamma (Kronberger et al., 1995).

Los macrófagos y los monocitos humanos difieren de otras células humanas, y principalmente de células de ratón (incluidos macrófagos de ratón), en que producen grandes cantidades de neopterina tras ser

estimulados, mientras que las demás células sintetizan igual o mayores cantidades de derivados de la biopterina. Esta característica de los monocitos y macrófagos humanos es debida a que las actividades de las enzimas que participan en la biosíntesis de la pteridina, 6-piruvoil-tetrahydropterina 2'-reductasa (EC 1.1.1.220) y sepiapterina reductasa (EC 1.1.1.153), son mucho menores que en las otras células, mientras que la actividad de la enzima guanosin trifosfato ciclohidrolasa I (EC 3.5.4.16) es particularmente alta (Werner et al., 1990).

Por otra parte se sabe que la neopterina es un indicador in vivo del estado de activación del sistema inmune celular, sobre todo en enfermedades caracterizadas por una activación de los linfocitos T y producción de interferon-gamma y por tanto, de una activación del sistema monocito-macrófago (Fuchs et al., 1988; Wachter et al., 1989; Reibnegger et al., 1991; Fuchs et al., 1992; Samsonov et al., 1992).

Los primeros estudios en humanos que revelan su importancia como marcador de la inmunidad mediada por célula (CMI) se remontan a 1979, en los que niveles altos se cuantificaron en pacientes que padecían cáncer o infecciones virales, lo cual podría reflejar la respuesta del huésped a las células tumorales o a las células transformadas por virus (Wachter et al., 1989). Estas afirmaciones también fueron probadas por diversos experimentos in vitro. La neopterina se detectó in vitro por primera vez en cultivos de linfocitos mezclados con células mononucleares de sangre periférica. Los monocitos y macrófagos humanos fueron la fuente específica de neopterina, cuando estaban activados con interferón-gamma. Otros potentes estimuladores de la actividad macrofágica como zymosan, acetato de forbol-

miristato (PMA), factor estimulador de colonias, factor estimulador de colonias de granulocitos/monocitos e interferón-beta no inducían la liberación de neopterinina. Otras células del sistema inmune como los linfocitos B, granulocitos, células "natural killer" o diversas líneas de células tumorales tampoco producían su estimulación, con la excepción de ciertos subclones de células tumorales malignas de la línea monocítica U937 (Fuchs et al., 1988).

Así, y según todos los datos conocidos, el único estimulador de los macrófagos humanos para que ocurra la liberación de neopterinina es el interferón-gamma. No tenemos conocimiento de experimentos que investiguen el papel de los neuropéptidos en la síntesis de neopterinina, ni si los niveles de ésta puede variar con los procesos de envejecimiento fisiológico, caracterizados por una progresiva desconexión entre los sistemas nervioso e inmune.

En nuestro trabajo hemos observado que cuando las células blancas de sangre total eran incubadas con neuropéptido Y, la síntesis de neopterinina era estimulada en la población anciana, sanos y diabéticos. También la somatostatina potenció la síntesis de neopterinina tanto en adultos jóvenes como en ancianos sanos y diabéticos, mientras que el GRP causó un aumento en los adultos jóvenes (Tabla XIX). Estos datos sugieren que existen in vivo otros potenciadores de la síntesis de neopterinina, que siendo estimulados por diversos procesos como enfermedades infecciosas, carcinomas, SIDA, etc..., en los cuales la respuesta inmune está comprometida pueden inducir su liberación y, por lo tanto aumentar sus niveles indicándonos así, el estado inmune y clínico del paciente.

5.3. VARIACIONES SEGUN LA EDAD DE LA PRODUCCION DE CITOQUINAS TRAS LA ESTIMULACIÓN CON DIVERSOS NEUROPEPTIDOS.

El proceso de envejecimiento se caracteriza por una serie de cambios que experimenta el sistema inmune. Aunque es evidente que existe una pérdida de la función inmunológica con la edad, tanto en humanos como en mamíferos (Solana et al., 1991; De la Fuente et al., 1993b), son los mecanismos de respuesta inmune específicos, llevados a cabo por los linfocitos, los que parecen fundamentalmente deteriorarse en la vejez (Ortega et al., 1993).

Por otra parte, es evidente la comunicación existente entre los diferentes sistemas de regulación animal: sistema nervioso, endocrino e inmune (Blalock, 1989). Durante el envejecimiento existe un paulatino declinar de las funciones de estos tres sistemas, y se ha propuesto como responsable de la carencia funcional de la vejez al deterioro en las relaciones que se establecen entre los sistemas reguladores modulados, entre otras sustancias, por neuropéptidos y citoquinas (Fabris, 1991).

Basándonos en estos cambios y después de examinar los resultados obtenidos, creemos que la pérdida de función en los organismos envejecidos podría estar ligada, por lo menos en parte, a una defectuosa o negativa interacción entre los neuropéptidos y la citoquinas. En este contexto podemos indicar que la función inmune, al igual que otras funciones celulares, depende en alto grado de la respuesta de las citoquinas a diversos estímulos, entre

ellos los neuropéptidos investigados en este trabajo: neuropéptido Y, somatostatina, péptido intestinal vasoactivo y péptido liberador de gastrina.

Por lo indicado parece evidente el gran interés teórico-práctico que tiene el estudio de los niveles de citoquinas en función de la edad de la población, y de su respuesta a agentes reguladores como son los neuropéptidos que intervienen en la homeostasis del sistema inmune.

Según los resultados obtenidos, los neuropéptidos investigados pueden modular a concentraciones fisiológicas la respuesta inmune e inflamatoria, estimulando la producción de citoquinas de forma diferente dependiendo de la edad de los grupos de estudio.

La bibliografía revisada ofrece pocos datos sobre la influencia del envejecimiento en la producción de citoquinas en humanos y ninguno respecto al efecto regulador de los neuropéptidos sobre la producción de citoquinas según la edad. Chandra (1990) demostró un incremento en la síntesis de IL-6 asociado a la edad en ratones MRL/pr. Effros et al. (1991) observaron que macrófagos peritoneales de ratones de 24 meses producían más TNF-alfa e IL-6 cuando se estimulaban con LPS que ratones de 8 meses. Foster et al. (1992) han cuantificado las concentraciones plasmáticas de IL-6 y TNF-alfa en un grupo control de ratas Fisher y en otro grupo de ratas después de 90 minutos de inyectarles LPS. Las ratas de varias edades a las que no se les inyectó LPS presentaron valores basales de IL-6 y TNF-alfa muy bajos o indetectables, mientras que las ratas viejas (24 meses) mostraron concentraciones plasmáticas de IL-6 y TNF-alfa mucho más elevadas que las ratas maduras (12-15 meses) y jóvenes (3-5 meses).

Así mismo, un aumento significativo de la producción de IL-6 se ha observado en cultivos de células polimorfonucleares de ancianos sanos y no en adultos jóvenes sanos (Fagiolo et al., 1992). Arnalich et al. (1994) han demostrado una sobreproducción de IL-6 en ancianos sanos respecto a jóvenes sanos tras la estimulación con un mitógeno y no han observado diferencias significativas en la síntesis de IL-1 β y TNF-alfa entre ambos grupos.

Nuestros datos muestran un aumento significativo de la producción de las tres citoquinas tras estimular con LPS en los jóvenes y ancianos sanos. Sin embargo, sólomente en la síntesis de IL-1 β encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, presentando los ancianos los valores más elevados (Tabla IX). Estas diferencias en la síntesis de citoquinas pueden ser características del envejecimiento fisiológico, tanto en animales como en seres humanos (Ershler, 1993).

Hirokawa et al. (1994) observaron una disminución en la producción de IL-2 tras estimulación antigénica, explicando este hecho por una pérdida de las funciones inmunes que ocurren principalmente en las células T dependientes durante el envejecimiento. Por el contrario, otros autores han demostrado un aumento de la síntesis de IL-4, IL-5 e IL-6 con el envejecimiento (Kubo y Cinander, 1990; Song et al., 1993; Arnalich et al., 1994).

Ortega et al. (1993) y de la Fuente et al. (1990, 1994b) han demostrado una hiperactividad del sistema monocito-macrófago en el envejecimiento, lo cual podría explicar los resultados encontrados en este trabajo respecto al

aumento de la síntesis de IL-1 β por leucocitos de sangre periférica en respuesta al LPS que presentaron los sujetos ancianos sanos.

En este estudio no encontramos diferencias entre adultos jóvenes y ancianos sanos en la síntesis de IL-1 β cuando estimulamos las células blancas de sangre periférica con neuropéptido Y (Figura 4), somatostatina (Figura 5) y péptido intestinal vasoactivo (Figura 6). Sin embargo, cuando incubamos los leucocitos con péptido liberador de gastrina la síntesis de IL-1 β se potenció significativamente más en ancianos sanos que en adultos jóvenes (Figura 7).

Cuando estimulamos con somatostatina la síntesis de IL-6 (Figura 9) y TNF-alfa (Figura 13) fue similar en ambos grupos de edad, al igual que la producción de TNF-alfa cuando incubamos con neuropéptido Y (Figura 12), pero no de IL-6 que experimentó un descenso. El péptido intestinal vasoactivo originó un incremento mayor en la síntesis de IL-6 y TNF-alfa en ancianos sanos que en adultos jóvenes (Figuras 10 y 14) al igual que el péptido liberador de gastrina (Figuras 11 y 15).

Por otra parte, cuando añadimos péptido liberador de gastrina a las muestras incubadas con lipopolisacárido y determinamos posteriormente IL-6 observamos un efecto sinérgico entre el neuropéptido y el activador policlonal sobre las síntesis de la citoquina en los leucocitos del grupo de ancianos sanos respecto a los adultos jóvenes (Tabla XIII). Esta misma acción sobre la IL-6 fue observada con el péptido intestinal vasoactivo (Tabla XIII) en ambos grupos, aunque en los ancianos sanos el incremento en la síntesis de IL-6 inducida por el lipopolisacárido fue mucho mayor (Tabla XIII). Además,

el péptido intestinal vasoactivo (Figura 14) y el péptido liberador de gastrina (Figura 15) inhibieron la síntesis de TNF-alfa inducida por el lipopolisacárido en los adultos jóvenes, pero no en el grupo de ancianos.

Los resultados encontrados confirman la interrelación entre los sistemas inmune y nervioso, a la vez que se muestra una ruptura en esta relación durante el envejecimiento. Aunque la edad se asocia con una función inmune disminuída en concordancia con una pérdida funcional de las células T (Fabris, 1991), la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF-alfa en respuesta al neuropéptido Y, somatostatina, péptido intestinal vasoactivo y péptido liberador de gastrina no disminuye en ancianos sanos respecto a adultos sanos, sino que como en el caso del péptido liberador de gastrina se incrementa.

5.4. MODULACION NEUROPEPTIDICA DE LA PRODUCCION DE CITOQUINAS EN ANCIANOS DIABETICOS NO INSULIN-DEPENDIENTES. DIFERENCIAS CON ANCIANOS SANOS.

La diabetes mellitus no insulín-dependiente (DMNID) es un síndrome heterogéneo plurietiológico de naturaleza no autoinmune, pero que cursa frecuentemente con alteraciones de la inmunidad celular que permanecen mal estudiadas. Los polimorfonucleares y macrófagos peritoneales de ratones obesos tipo Zucker (*fa/fa*), un modelo experimental de DMNID, poseen una significativa menor capacidad para destruir células de *Candida albicans* fagocitadas que sus homónimos ratones Zucker no obesos (Plotkin et al.,

1996). La capacidad de fagocitosis de los leucocitos polimorfonucleares (LPMN) está reducida tanto en pacientes con diabetes insulín-dependiente como en pacientes con DMNID (Marhoffer et al., 1992), y también se ha demostrado una reducida capacidad bactericida intracelular de los monocitos de pacientes con DMNID (Chang, 1995b). Recientemente, en un conjunto de 34 pacientes con DMNID se ha comprobado una significativa reducción de la respuesta proliferativa de las células mononucleares de sangre periférica frente a fitohemaglutinina, concanavalina A y (phorbol myristate acetate), respecto a un grupo de voluntarios sanos. La causa de ese déficit de inmunidad celular no está bien aclarado, pero puede atribuirse a varios factores, como son una menor expresión de moléculas de CR3 en los monocitos y una deficiente expresión de receptores para IL-2 de los linfocitos (Chang, 1995a).

En el presente trabajo abordamos otro aspecto de la respuesta inmune citomediada en pacientes con DMNID, es decir el estudio de la modulación y control neuropeptídico de la producción de citoquinas proinflamatorias por leucocitos de sangre periférica incubados. La población estudiada de ancianos con DMNID presentaba unas características demográficas y clínicas similares a las de otro grupo de ancianos sanos. Tras el estímulo con LPS, los leucocitos de sangre periférica de los ancianos diabéticos presentaban una significativa menor producción de IL-1 β , IL-6 y TNF, y también era significativamente inferior la producción de estas tres citoquinas cuando se estimulaban los leucocitos de sangre periférica con LPS en combinación con cualquiera de los neuropeptidos estudiados, es decir NPY, VIP, somatostatina y GRP, excepto la producción de TNF-alfa que fue superior en ancianos diabéticos cuando estimulábamos con somatostatina y GRP (Tablas XV, XVI

y XVII). La respuesta de producción de estas citoquinas tras la estimulación por separado con NPY (Figuras 4, 8 y 12) o somatostatina (Figuras 5, 9 y 13) fue similar en ancianos diabéticos y en los no diabéticos. La estimulación con VIP produjo una mayor producción de IL-6 (Figura 10), junto a una menor respuesta de IL-1 β (Figura 6) y TNF-alfa (Figura 14) en los ancianos diabéticos respecto a los no diabéticos, en tanto que la estimulación con GRP causó una significativa mayor producción de TNF (Figura 15), pero una menor respuesta de IL-1 β e IL-6, en el grupo de ancianos con DMNID (Figuras 7 y 11). Se ha demostrado que algunos neuropéptidos como la colecistoquinina parece aumentar la concentración intracelular de calcio en los linfocitos y monocitos y ello pudiera aumentar también la respuesta a mitógenos in vitro (Ferrara et al., 1990). También es conocido que la producción de citoquinas por los leucocitos de sangre periférica activados es un proceso regulado por la concentración intracelular de calcio que actúa como segundo mensajero a través de un sistema de señales dependiente de la proteína C-kinasa (Alexiewicz et al., 1995). En los pacientes con DMNID parece existir en condiciones basales un aumento anormal de calcio libre citosólico en los leucocitos de sangre periférica (Cunningham et al., 1995). La diferente respuesta de producción de citoquinas proinflamatorias observada en ancianos diabéticos y no diabéticos tras la incubación de leucocitos de sangre periférica con LPS, o con los neuropéptidos que hemos estudiado (NPY, somatostatina, VIP y GRP), creemos que podría estar en relación con un diferente contenido de calcio intracelular en dichas células.

CONCLUSIONES

1. El neuropéptido Y induce un aumento en la producción de IL-1 β y TNF-alfa en los tres grupos de población estudiada y una disminución en la producción de IL-6 en el grupo de ancianos diabéticos. El efecto del LPS sobre la síntesis de IL-1 β aumenta al añadir neuropéptido Y en los jóvenes, existiendo un efecto aditivo entre el neuropéptido y el mitógeno. Por otra parte el NPY inhibió ligeramente la síntesis de IL-6 inducida por el LPS y no modificó la producción de TNF-alfa.

2. La somatostatina potencia la síntesis de IL-1 β en los adultos jóvenes y en los ancianos sanos, así como de TNF-alfa en los tres grupos del estudio. La síntesis de IL-6 no se modifica por la acción del neuropéptido. Por otra parte, la somatostatina tampoco influye en la síntesis de citoquinas inducida por el LPS.

3. El péptido intestinal vasoactivo originó un aumento de la síntesis de IL-1 β y de IL-6 tanto en adultos jóvenes como en ancianos sanos, y de TNF-alfa en los ancianos sanos. Además, la síntesis de IL-6 inducida por el LPS aumentó, mientras que la producción de TNF-alfa se inhibió cuando añadimos el neuropéptido.

4. El péptido liberador de gastrina causó un aumento de la síntesis de IL-1 β en los dos grupos de ancianos y de IL-6 en toda la población del estudio, mientras que inhibió la producción de TNF-alfa en los adultos jóvenes. Este mismo efecto inhibitorio sobre la síntesis de TNF-alfa en los adultos jóvenes también lo observamos al incubar las muestras con el neuropéptido y el LPS simultáneamente.

5. De los neuropéptidos investigados, sólo la somatostatina modificó la síntesis de leucotrieno B₄, causando una inhibición de la misma en el grupo de ancianos sanos.

6. Respecto a la producción de neopterina, el neuropéptido Y causó un aumento de su síntesis en la población anciana. Este incremento también se observó en los adultos jóvenes y ancianos sanos al estimular las células blancas de sangre periférica con somatostatina. El péptido intestinal vasoactivo no modificó la producción de neopterina y el péptido liberador de gastrina causó un ligero aumento en los adultos jóvenes y una disminución en la población anciana.

7. Basándonos en los resultados obtenidos los neuropéptidos investigados pueden modular, a concentraciones fisiológicas, la respuesta inmune e inflamatoria de forma diferente dependiendo de la edad de los individuos. Todo ello confirma la interrelación entre los sistemas inmune y nervioso, a la vez que muestra una ruptura de esta relación durante el envejecimiento.

RESUMEN

El conocimiento de que las citoquinas pueden modular muchos aspectos de la respuesta inmune nos ha llevado a estudiar el efecto que diversos neuropéptidos (neuropéptido Y, somatostatina, péptido intestinal vasoactivo y péptido liberador de gastrina) podrían ejercer sobre su síntesis y liberación. Así mismo, la influencia de los citados neuropéptidos pueden tener en la síntesis de otros mediadores de la respuesta inmune, como el leucotrieno B4 y la neopterina no es conocida.

Por otra parte se sabe que tanto el envejecimiento como determinadas enfermedades se asocian a una respuesta inmune deficiente o alterada. En este sentido se cree que la mayoría de las alteraciones asociadas al proceso fisiológico del envejecimiento podrían deberse a una alteración de las interacciones entre los sistemas nervioso e inmune.

Los resultados encontrados demuestran que el neuropéptido Y, somatostatina, péptido intestinal vasoactivo y péptido liberador de gastrina a concentraciones fisiológicas aumentan, en general, la producción in-vitro de IL-1 β , IL-6 y TNF-alfa por leucocitos humanos de sangre periférica en adultos jóvenes, ancianos sanos y ancianos diabéticos. Además, estos neuropéptidos pueden modular in-vivo la producción de citoquinas inducida por activadores policlonales tales como el lipopolisacárido.

Con respecto a la acción ejercida sobre otros mediadores de la respuesta inmune como el leucotrieno B4 y neopterina, observamos que los neuropéptidos investigados no modificaban la producción de leucotrieno B4 por células blancas de sangre periférica en ninguno de los grupos estudiados. Sin embargo si se incrementaba la síntesis de neopterina, en general, por la acción del NPY, somatostatina y GRP.

Los resultados encontrados confirman la interrelación entre los sistemas inmune y nervioso, a la vez que se muestra una ruptura de esta

relación durante el envejecimiento y en pacientes con diabetes mellitus no insulín dependiente, aunque la producción de citoquinas y otros mediadores se mantenga.

BIBLIOGRAFIA

Ader R, Felten D, Cohen N. Interactions between the brain and immune system. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 561-602.

Adrian TE, Allen JM, Terenghi G, Bacarese-Hamilton AJ, Brown MJ, Polack JM, Bloom SR. Neuropeptide Y in pheochromocytomas and ganglioneuroblastomas. *Lancet* 1983; 2: 540-542.

Alexiewicz JM, Kumar D, Smogorzewski M, Klin M, Massry S. Polymorphonuclear leukocytes in non-insulin-dependent diabetes mellitus: abnormalities in metabolism and function. *Ann Intern Med* 1995; 123: 919-924.

Aliakbari J, Streedharan SP, Turck CW, Goetzl EJ. Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biophys Res Commun* 1987; 148 (3): 1440-1445.

Allen JN, Herzyk DJ, Allen ED, Wewers MD. Human whole blood interleukin-1 β production: kinetics, cell source, and comparison with TNF- α . *J Lab Clin Med* 1992; 119: 538-546.

Andrews PC, Dixon JE. Biosynthesis and processing of somatostatin family of peptides hormones. *Scand J Gastroenterol* 1986; 21: 22-28.

Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Asthritis Rheum* 1990; 33: 305-315.

Arnalich F, De Miguel E, Pérez-Ayala C, Martínez E, Vázquez JJ, Gijón-Bañós

J, Hernanz A. Neuropeptides and interleukin-6 in human joint inflammation. Relationship between intraarticular substance P and interleukin-6 concentrations. *Neuroscience Letters* 1994; 170: 251-254.

Arnalich F, Hernanz A, Vázquez JJ, Amores A. Cell-mediated immune response and cytokine production in idiopathic senile anorexia. *Mech Ageing Dev* 1994; 77: 67-74.

Baker E, Hort YJ, Ball H, Sutherland GR, Shine J, Herzog H. Assignment of the human neuropeptide Y gene to chromosome 7p15.1 by nonisotopic in situ hybridization. *Genomics* 1995; 26: 163-164.

Balkwill F. Cytokines in health and disease. *Immunology Today* 1993; 14 (4): 149-150.

Bathena SJ, Lovie J, Schechter GP, Redman RJ, Wahl L, Recant L. Identification of human mononuclear leukocytes bearing receptors for somatostatin and glucagon. *Diabetes* 1981; 30: 127-131.

Beck-Sickinger A, Jung G. Structure-activity relationships of neuropeptide Y analogues with respect to Y1 and Y2 receptors. *Biopolymers* 1995; 37: 123-142.

Beed EA, O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, Gagginella TS. Demonstration of a functional receptor for vasoactive intestinal polypeptide on Molt 4B T lymphoblasts. *Reg Pept* 1983; 6: 1-4.

Bellanti JA. Cytokines and the immune response. *Pediatric clinics of North America. Clinical Immunology* 1994; 41 (4): 597-621.

Bellinger DL, Ackermann KD, Felten SY, Lorton D, Felten DL. 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 JW, Masek K, Nistico G. Pythagora Press, Roma. Milan, 1989.

Bernier J, Reuter A, Vrindts-Gevaerts Y, Gathy-Meulemans R, Frere MC, Franchimont P. Radio-immunological study of the regulation of interleukin-2 production in peripheral blood mononuclear cell culture from normal subjects and rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 1989; 7: 35-41.

Bernton EW, Beach JE, Holaday JW, Smallridge RE, Fein HG. Release of multiple hormones by direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 1987; 238: 519-521.

Bjurholm A, Kreicbergs A, Ahmed M, Schultzberg M. Noradrenergic and peptidergic nerves in the synovial membrane of the Sprague- Dawley rat. *Arthr Rheum* 1990; 33: 859-865.

Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J Immunol* 1984; 132: 1067-1070.

Blalock JE. A molecular basis for bidirectional communication between the immune system and neuroendocrine systems. *Physiological Reviews* 1989; 69

(1): 1-32.

Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunology Today* 1994; 15 (11): 504-511.

Bondesson L, Nordlind K, Linden S, Gafvelin G, Theodorsson E, Mutt V. Dual effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) on leukocyte migration. *Acta Physiol Scand* 1991; 141: 477-481.

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* 1991; 29: 29-41.

Brazeau P, Vale W, Burgus R, et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973; 173: 77-79.

Brito BE, Romano EL, Grunfeld C. Increased lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor levels and death in hypercholesterolaemic rabbits. *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 357-361.

Brooks WH, Cross RJ, Roszman TL, Markesbery WR. Neuroimmunomodulation: neural anatomical basis for impairment and facilitation. *Ann Neurol* 1982; 12: 56-

Brown M, Rivier J, Kobayashi R, Vale W. Neurotensin-like and BN-like peptides: CNS distribution and actions. *Gut Hormones* (ed. Bloom SR) p.p.

550-558. Churchill Livingstone, Edimburg (1978).

Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl Med* 1988; 318: 1315-1321.

Bunnett N. Gastrin-releasing peptide. In J.H. Walsh and G.J. Dockray, *Gut Peptides: Biochemistry and Physiology*, Raven Press, New York, 1994, pp. 423-445.

Burton BT, Foster WR. Health implications of obesity: an NIH Consensus Development Conference. *J Am Diet Assoc* 1985; 85: 1117-1121.

Calvo C-F, Chavanel G, Senik A. Substance P enhances IL-2 expression in activated human T cells. *J Immunol* 1992; 48: 3498-3504.

Cambronero JC, Rivas FJ, Borrell J, Guaza C. Interleukin-1 β induces pituitary adrenocorticotropin secretion: evidence for glucocorticoid modulation. *Neuroendocrinology* 1992; 55: 648-654.

Cardigan SR, Hayday AC, Bottomly K. Cytokines in T-cell development. *Immunology Today* 1991; 12: 239-245.

Carstens J, Teglbjaerg LS, Black FT. Neopterin and β_2 -microglobulin as serum markers in a placebo-controlled anti-HIV therapy trial. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 559-562.

Cavaillon JM, Muñoz C, Fitting C, et al. Circulating cytokines: the tip of the iceberg?. *Circ Shock* 1992; 38: 145-149.

Cook GA, Elliot D, Metwali A, Blum AM, Sandor M, Lynch R, Weinstock JV. Molecular evidence that granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis *mansoni* express an authentic substance P (NK-1) receptor. *J Immunol* 1994; 152: 1830-1835.

Cutz E, Chan W, Track NS, Goth A, Said SI. Release of vasoactive intestinal peptide in mast cells by histamine liberators. *Nature* 1978; 275: 661-662.

Chang FY, Shaio MF. Decreased cell-mediated immunity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1995a; 28: 137-146.

Chang FY, Shaio MF. Respiratory burst activity of monocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1995b; 29: 121-127.

Chandra RK. The relation between immunology, nutrition and disease in elderly people. *Age Ageing* 1990; 19: 25-31.

Chofflon M, Juillard C, Juillard P, Gauthier G, Grau GE. Tumor necrosis factor alfa production as a possible predictor of relapse in patients with multiple sclerosis. *Eur Cytokine Netw* 1992; 3: 523-531.

Cunningham ME, Shaw-Stiffel TA, Bernstein LH, Tinghitella TJ, Claus RE,

Brogan DE, McMillen MA. Cholecystokinin-stimulated monocytes produce inflammatory cytokines and eicosanoids. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 6212-625.

Dahinden CA, Wirthmueller U. Release and metabolism of leukotriene B4 in neutrophil-mast cell interactions. *Methods Enzymol* 1990; 187: 567-577.

Danek A, O'Dorisio S, O'Dorisio TM, George JM. Specific binding sites for vasoactive intestinal polypeptide on nonadherent peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 1983; 131: 1173-1177.

Dawbarn D, Hunt SP, Emson P. Neuropeptide Y: Regional distribution chromatographic characterization and immunohistochemical demonstration in post-mortem human brain. *Brain Res* 1984; 296: 168-173.

Debets R, Savelkoul HFJ. Cytokine antagonists and their potential therapeutic use. *Immunology Today* 1994; 15 (10): 455-459.

Deforge LE, Reemick DG. Kinetic of TNF, IL-6 and IL-8 gene expression in LPS stimulated whole blood. *Biochem Biophys Res Comm* 1991; 174: 18-24.

De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F, Pirenne J, Gathy R, López M Dehart I, Igot D, Baudrihayé M, Delacroix D, Franchimont. Direct stimulation of cytokines (IL-1beta, TNF-alfa, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 1992; 4: 239-248.

Delgado M, De la Fuente M, Martínez C, Gomariz RP. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides (PACAP27 and PACAP38) inhibit the mobility of murine thymocytes and splenic lymphocytes: comparison with VIP and implication of cAMP. *J Neuroimmunol* 1995; 62: 137-146.

De la Fuente M, Del Río M, Ferrández MD, Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology* 1991; 73: 205-211.

De la Fuente M, Miquel J. Efecto protector de antioxidantes tiólicos en la inmunodepresión asociada al envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 1994b; 29: 246-251.

De la Fuente M, Bernáez I, Del Río M, Hernanz A. Stimulation of murine peritoneal macrophage functions by neuropeptide Y and peptide YY. Involvement of protein kinase C. *Immunology* 1993a; 80: 259-265.

De la Fuente M, Delgado M, Del Río M, Martínez C, Hernanz A, Gómariz RP. Stimulation by vasoactive intestinal peptide (VIP) of phagocytic function in rat macrophages. Protein kinase C involvement. *Regul Pept* 1993b; 41: 345-353.

De la Fuente M, Delgado M, Del Río M, Garrido E, Leceta J, Hernanz A, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide modulation of adherence and mobility in rat peritoneal lymphocytes and macrophages. *Peptides* 1994a; 15: 1157-1163.

De la Fuente M, Martín I, Ortega E. Changes in the phagocytic function of

peritoneal macrophages from old mice after strenuous physical exercise. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1990; 13: 189-198.

Del Río M, De la Fuente M. Chemoattractant capacity of bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C is mediated through PKC activation in murine peritoneal leukocytes. *Regul Pept* 1994; 49: 185-193.

Del Río M, Hernanz A, De la Fuente M. Bombesin, Gastrin-releasin peptide, and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C. *Peptides* 1994; 15: 15-22.

Desch CE, Kovach NL, Present W, Broyles C, Harlan JM. Production of human tumor necrosis factor from whole blood ex vivo. *Lymphokine Res* 1990; 8: 141-146.

Dinareello CA. Role of interleukin-1 in infectious diseases. *Immunol Rev* 1992; 127: 119-146.

Djeu JY, Serbovsek D, Blanchard DK. Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1990; 76: 1405-1409.

Dockray GJ, Vaillant C, Walsh JH. The neuronal origin of bombesin-like immunoreactivity in rat gastrointestinal tract. *Neuroscience* 1978; 4: 1561.

Drenth JPH, Powell RJ, Brown NS, Van Der Meer WM. Interferon-gamma and urine neopterin in attacks of the hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 683-686.

Dubravec DB, Spriggs DR, Mannick JA, Rofrick ML. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6758-6761.

Dumont Y, Martel JC, Fournier A, St.-Pierre S, Quirion R. Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. *Prog Neurobiol* 1992; 38: 125-127.

Edvinson L, Hakanson R, Wahlestedt C, Uddman R. Effects of neuropeptide Y on the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci* 1987; 8: 231-235.

Effros RB, Svoboda K, Walford RL. Influence of age and caloric restriction on macrophage IL-6 and TNF production. *Lymphokine Cytokin Res* 1991; 10: 347-351.

Ellaurie M, Yost SL, rosentreich DL. A simplified human whole blood assay for measurement of dust mite-specific gamma interferon production in vitro. *Ann Allergy* 1991; 66: 143-147.

Ercal N, O`Dorisio MS, Vinik A, O`Dorisio TM, Kadrofske M. Vasoactive intestinal peptide receptors in human platelet membrane: characterization of binding and functional assay. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 527: 663-666.

Ericsson A, Hemsén A, Lundberg JM, Persson H. Detection of neuropeptide Y-like immunoreactivity and messenger RNA in rat platelets: the effect of vinblastine, reserpine and dexamethasone on NPY expression in blood cells. *Exp Cell Res* 1991; 192: 604-607.

Ershler WB. Biomarkers of aging: Immunological events. *Exp Gerontol* 1988; 23: 387-389.

Ershler WB. Interleukin-6: A cytokine for gerontologists. *J Am Geriatr Soc* 1993; 41: 176-181.

Evans RD, Argilés JM, Williamson DH. Metabolic effects of tumour necrosis factor- α (cachectin) and interleukin-1. *Clin Sci* 1989; 77: 357-364.

Fabris N. Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach aging. *Arch Gerontol Geriatr* 1991; 12: 219-230.

Fagiolo V, Cossarizza A, Santacaterina S, Ortolani C, Monti D, Paganelli R, Franceschi C. Increased cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from healthy elderly people. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 21: 490-493.

Feinmark SJ. Leukotriene B₄ biosynthesis during polymorphonuclear leukocyte-vascular cell interactions. *Methods Enzymol* 1990; 187: 559-567.

Feldmann M, Brennan FM, Chantry D, Haworth C, Turner M, Katsikis P, Londei M, Abney E, Buchan G, Barret K, Corcoran A, Kissonerghis M, Zheng R, Grubeck-Loebenstein B, Barkley D, Chu CQ, Field M, Maini RN. Cytokine assays: role in evaluation of the pathogenesis of autoimmunity. *Immunol Rev* 1991; 119: 105-123.

Felten DL, Felten SY, Carlson SL, Ooschowska JA, Livnat S. *J Immunol* 1985;

135: 7555-7655.

Ferrara A, McMillen MA, Schaefer HC, Zucker KA, Modlin IM. Effect of cholecystokinin receptor blockade on human lymphocyte proliferation. *J Surg Res* 1990; 48: 354-357.

Fink R, Ehrhardt R, Daneygier H. Bombesine and its analogues inhibit interleukin-2 induced proliferation of CTLL-2 cells. *Reg Pept* 1988; 23: 323-330.

Flint Beal M, Mazurek MF, Tran VT, Chatta G, Bird E, Martin J. Reduced numbers of somatostatin receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Science* 1985; 229: 289-291.

Fontana A, Kristensen F, Dubs R, Gemsa D, WEber E. Production of PGE₂ and IL-1 like factors by culture astrocytes and C6 glioma cells. *J Immunol* 1982; 129: 2413-2419.

Foreman JC, Piotrowski W. Peptides and histamine release. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 127-130.

Foster KD, Conn CA, Kluger MJ. Feveer, tumor necrosis factor and interleukin-6 in young, mature and Fischer 344 rats. *Am J Physiol* 1992; 262: R211-R215.

Frisancho AR. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr* 1981; 34: 2540-2545.

Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Dierich MP, Wachter H. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in HIV-1 infection. *Immunol Today* 1988; 9: 150-155.

Fuchs D, Weiss G, Reibnegger G, Wachter H. The role of neopterin as a monitor of cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectious and malignant diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992; 29: 307-341.

Fuhlendorff J, Langeland Johansen N, Melberg SG, Thøgersen H, Schwartz. The antiparallel pancreatic polypeptide fold in the binding of neuropeptide Y to Y1 and Y2 receptors. *J Biol Chem* 1990; 265: 11706-11712.

Gaillard RC, Turnill D, Sappino P, Muller AF. Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinology* 1990; 127: 101-106.

Ganea D, Sun L. Vasoactive intestinal peptide downregulates the expression of IL-2 but not IFN γ from stimulated murine T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1993; 47: 147-158.

Gehlert DR. Subtypes of receptors for neuropeptide Y: Implications for the targeting of therapeutics. *Life Sci* 1994; 55: 551-562.

Gehr G, Gentz R, Brockhaus M, Loetscher H, Lesslauer W. Both tumor necrosis factor receptor types mediate proliferative signals in human mononuclear cells activation. *J Immunol* 1992; 149: 911-914.

Gomariz RP, De la Fuente M, Hernanz A, Leceta J. Occurrence of vasoactive intestinal peptide (VIP) in lymphoid organs from rat and mouse. *Ann N Y Sci* 1992; 650: 13-17.

Gomariz RP, Delgado M, Naranjo JR, Mellstrom B, Tormo A, Mata F, Leceta J. VIP gene expression in rat thymus and spleen. *Brain, Behaviour and Immunity* 1993; 7: 271-278.

Gomariz RP, Leceta J, Garrido E, Garrido T, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA expression in rat B and T lymphocytes. *Reg Pept* 1994; 50: 177-184.

Gomariz RP, Lorenzo MJ, Cacicedo L, Vicente A, Zapata AG. Demonstration of immunoreactive VIP and somatostatin in rat thymus. *Brain, Behaviour and Immunity* 1990; 4: 151-156.

Grundemar L, Håkanson R. Neuropeptide Y effector systems: perspectives for drug development. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 153-159.

Guaza C, Borrell J. Prostaglandins and CRF release from in vitro perfused rat hypothalamus by interleukins. Effect of dexamethasone treatment. *Eur J Neuroscience* 1993; Suppl 6: 254.

Guerrero JM, Prieto JC, Elorza FL, Ramírez R, Goberna R. Interaction of vasoactive intestinal peptide with human blood mononuclear cells. *Mol Cell Endocrinol* 1981; 21: 151-160.

Haefeli WE, Bargetz MJ, Starners HF, Blaschke TF, Hoffmann BB. Evidence for activation of the sympathetic nervous system by recombinant human IL-1 β in humans. *J Immunotherapy* 1993; 13: 136-140.

Heilig M, Widerlöv E. Neuropeptide Y: an overview of central distribution, functional aspects and possible involvement in neuropsychiatric illness. *Acta Psychiatr Scand* 1990; 82: 95-114.

Hernanz A. Characterization and distribution of bombesin-like peptides in the rat brain and gastrointestinal tract. *Biochem Cell Biol* 1990; 69: 1142-1145.

Hernanz A, De Miguel E, Romera N, Pérez de Ayala C, Gijón J, Arnalich F. Calcitonin gene-related peptide II, substance P and vasoactive intestinal peptide in plasma and synovial fluid from patients with inflammatory joint disease. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 31-35.

Heumann D, Gally P, Barras C, Zaech P, Ulevitch RJ, Tobías PS, Glauser M-P, Baumgartner JD. Control of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-induced tumor necrosis factor secretion in human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1992; 148 (11): 3505- 3512.

Hill HR. Modulation of host defenses with interferon-gamma in pediatrics. *J Infect Dis* 1990; 167: S23.

Hirokawa K, Utsuyama M, Zeng Y-X, Kurashima C, Kasai M. Immunological alterations with aging-laying a stress on recent progress in Japan. *Arch Gerontol Geriatr* 1994; 19: 171-183.

Hökfelt T. Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron* 1991; 7: 867-879.

Homo-Delarche F, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y: a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 1982; 296: 659-660.

Homo-Delarche F, Dardenne M. The neuroendocrine-immune axis. *Springer Semin Immunopathology* 1993; 14: 221-238.

Hort Y, Baker E, Sutherland GR, Shine J, Herzog H. Gene duplication of the human peptide YY gene (PYY) generated the pancreatic polypeptide gene (PYY) on chromosome 17q21.1. *Genomics* 1995; 26: 77-83.

Inglada L, Saló J, Arroyo V. Neuropeptide Y: un nuevo vasoconstrictor endógeno importante en la homeostasis circulatoria. *Med Clin (Barc)* 1993; 100: 751-756.

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* 1991; 5: 3100-3113.

Ishioka C, Yoshida A, Kimata H, Mikawa H. Vasoactive intestinal peptide stimulates immunoglobulin production and growth of human B cells. *Clin Exp Immunol* 1992; 87: 504-508.

Jin G-F, Guo Y-S, Houston CW. Bombesin: an activator of specific aeromonas

antibody secretion in rat intestine. *Dig Dis Sci* 1989; 34: 1708- 1712.

Jin G-F, Guo Y-S, Smith ER, Houston CW. The effect of bombesin-related peptides on the phagocytic function of mouse phagocytes in vitro. *Peptides* 1990; 11: 393-396.

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* 1989; 137: 107-111.

Jones DA, Fitzpatrick FA. Leukotriene B4 synthesis by erythrocyte-neutrophil interactions. *Methods Enzymol* 1990; 187: 553-559.

Kato K, Yokoi T, Takano N, et al. Detection by in situ hybridization and phenotypic characterization of cells expressing IL-6 mRNA in human stimulated blood. *J Immunol* 1990; 144: 1317-1321.

Kimball E, Persico F, Vaught JL. Substance P, neurokinina A, and neurokinina B induce generation of IL-1-like activity in P388D1 cells. *J Immunol* 1988; 141: 3564-3569.

Kirchner H, Kleinicke C, Digel W. A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. *J Immunol Methods* 1982; 48: 213-219.

Koff WC, Dunegan MA. Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones. *J Immunol* 1985; 135: 350-354.

Kogner P, Ericsson A, Barbany G, Persson H, Theodorsson E, Björk O. Neuropeptide Y (NPY) synthesis in lymphoblasts and increased plasma NPY in pediatric B-cell precursor leukemia. *Blood* 1992; 80: 1324-1329.

Krcso CJ, Gores A, Go VLW. Gastrointestinal regulatory peptides modulate mouse lymphocyte functions under serum-free conditions in vitro. *Immunol Invest* 1986; 15: 103-111.

Kriegler M, Pérez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; 53: 45-53.

Kroegel C, Giembycz MA, Barnes PJ. Characterization of eosinophil cell activation by peptides: differential effects of substance P, melittin, and FMET-Leu-Phe. *J Immunol* 1990; 145: 2581-2584.

Kronberger P, Weiss G, Tschmelitsch J, Fuchs D, Salzer GM, Wachter H, Reinegger G. Predictive value of urinary neopterin in patients with lung cancer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 831-837.

Kubo M, Cinander B. Polymorphism of age-related changes in IL-2, IL-3 and IL-4. *Eur J Immunol* 1990; 20: 1289-1296.

Kulseng B, Skjåk-Braek G, Folling I, Espevik T. TNF production from peripheral blood mononuclear cells in diabetic patients after stimulation with alginate and lipopolysaccharide. *Scand J Immunol* 1996; 43: 335-340.

Larhammar D. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regulatory Peptides* 1996a; 62: 1-11.

Larhammar D. Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regulatory Peptides* 1996b; 65: 165-174.

Larhammar D, Blomquist AG, Berglund MM, Söderberg C. Evolution of neuropeptide Y and its related peptides. *Comp Biochem Physiol* 1993; 106: 743-752.

Laurentzi MA, Person MAA, Dalsgaard C, Hoegerstrand A. The neuropeptide substance P stimulates production of interleukin-1 in human blood monocytes: activated cells are preferentially influenced by the neuropeptide. *Scand J Immunol* 1990; 31: 529-532.

Leeuwenberg JFM, Jeunhomme TMAA, Buurman WA. Slow release of soluble TNF receptors by monocytes in vitro. *J Immunol* 1994; 152: 4036-4039.

Lemaire I. Neurotensin enhances IL-1 production by activated alveolar macrophages. *J Immunol* 1988; 140: 2983-2988.

Levine JD, Clark R, Devor M, Helms C, Moskowitz MA, Basbaum AI. Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science* 1984; 226: 547-549.

Levine JD, Dardick SJ, Basbaum AI, Scipio E. Reflex neurogenic inflammation: I. Contribution of the peripheral nervous system to spatially remoted

inflammatory response that follow injury. *J Neurosci* 1985; 5: 1380-1386.

Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* 1990; 323: 645-655.

Liles WC, Meier KE, Henderson WR. Phorbol myristate acetate and the calcium ionophore A23187 synergistically induce release of LTB₄ by human neutrophils: involvement of protein kinase C activation in regulation of the 5-lipoxygenase pathway. *J Immunol* 1987; 138: 3396-3399.

Litwin DK, Wilson AK, Said SI. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) inhibits rat alveolar macrophage phagocytosis and chemotaxis in vitro. *Reg Peptides* 1992; 40: 63-74.

Lord PC, Wilmoth LM, Mizel SB, McCall CE. Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1991; 87: 1312-1321.

Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988; 241: 1218-1221.

Lucey MR. Endogenous somatostatin and gut. *Gut* 1986; 27: 457-467.

Lygren I, Revhang A, Burhol PG, Gierckys KE, Jensen TG. Vasoactive intestinal peptide and somatostatin in leukocytes. *Scand J Clin Lab Invest* 1984; 44: 347-351.

Lyte M. Generation and measurement of IL-1 and IL-2 and mitogen levels in small volumes of whole blood. *J Clin Lab Analysis* 1987; 1: 83-86.

Madden KS, Felten DL. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol Rev* 1995; 75: 77-105.

Maisel AS, Scott NA, Motulsky HJ, et al. Elevation of plasma neuropeptide Y levels in congestive heart failure *Am J Med* 1989; 86: 43-48.

Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* 1992; 15: 256-260.

Marucha PT, Zeff RA, Kreutzer DL. Cytokine regulation of IL-1beta gene expression in the human polymorphonuclear leukocyte. *J Immunol* 1990; 145: 2932-2937.

Mascardo RN, Barton RW, Sherline P. Somatostatin has an antiproliferative effect on concanavalin A-activated rat thymocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1984; 33: 131-138.

Mathew RC, Cook GA, Blum AM, Metwali A, Felman R, Weinstock JV. Vasoactive intestinal peptide stimulates T lymphocytes to release IL-5 in murine schistosomiasis mansoni infection. *J Immunol* 1992; 148: 3572-3577.

Mayatepek E, Hassler D, Maiwald M. Enhanced levels of LTB₄ in synovial fluid in Lyme disease. *Mediat Inflamm* 1993a; 3: 225-228.

Mayatepek E, Becker K, Gana L, Hoffmann GF, Leichsenring M. Leukotrienes in the pathophysiology of kwashiorkor. *Lancet* 1993b; 342: 958-960.

Mayatepek E, Hoffmann GF, Carlsson B, Larsson A, Becker K. Impaired synthesis of lipoxygenase products in glutathione synthetase deficiency. *Pediatr Res* 1994; 35: 305-310.

Mayatepek E, Hoffmann GF. Leukotrienes: Biosynthesis, metabolism, and pathophysiologic significance. *Pediatric Research* 1995; 37 (1): 1-9.

McCloskey DI, Potter EK. Neuropeptide Y and cardiovascular regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1991; 18: 47-49.

McCoy JG, Avery DD. Bombesin: potential integrative peptide for feeding and satiety. *Peptides* 1990; 11: 595-607.

McDonald TJ, Ghatei MA, Bloom SR, Adrian TE, Mochizuki T, Yanaihara C, Yanaihara N. Dose-response comparisons of canine plasma gastroenteropancreatic hormone responses to bombesin and the porcine gastrin-releasing peptide. *Reg Pept* 1983; 5: 125-137.

McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 90: 227-231.

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 Resactions Exp and Clin Aspects* 1992; 14: 195-201.

Merril JE. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and related cytokins in brain development. *Normal and Pathological Dev* 1992; 14: 1-10.

Metal'nikov S, Chorine V. Role de reflexes conditionnels dans l'immunité. *Ann Inst Pasteur Paris* 1926; 40: 893-900.

Meuer SC, Dummer H, Meyer zum Buschenfelde KH, et al. Low-dose interleukin-2 induces systemic immune response against HBsAg in immunodeficient non-responders to hepatitis B vaccination. *Lancet* 1989; 1: 15.

Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin C: a bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 119:14.

Moody TW, Cuttita F. Growth factors and peptide receptors in small cell lung cancer. *Life Science* 1993; 52: 1161-1173.

Moore TC, Spruck CH, Said SI. Depression of lymphocyte traffic in sheep by vasoactive intestinal peptide (VIP). *Immunology* 1988; 64: 1-4.

Morley JE, Kay NE, Solomon GF, Plotnikoff NP. Neuropeptides: conductors of the immune orchestra. *Life Sciences* 1987; 41: 527-544.

Morris MJ, Elliot JM, Cain MD, Kapoor V, West MJ, Chalmers JP. Plasma

neuropeptide Y levels rise in patients undergoing exercise test for the investigations of chest pain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1986; 13: 437-440.

Morrison DC, Lei M, Kirikae T, Chen T. Endotoxin receptors on mammalian cells. *Immunobiology* 1993; 187: 212-216.

Nair MPN, Schwartz SA, Wu K, Kronfol Z. Effect of neuropeptide Y on natural killer activity of normal human lymphocytes. *Brain, Behaviour and Immunity* 1993; 7: 70-78.

Nata K, Yonekura H, Yamamoto H, Okamoto H. Identification of a novel 65-kDa cell surface receptor common to pancreatic polypeptide, neuropeptide Y and peptide YY. *Biochem Biophys Res Comm* 1990; 171: 330-335.

Nordlind K, Mutt V. Influence of beta-endorphins, somatostatin, substance P and vasoactive intestinal peptide on the proliferative response of human peripheral blood T lymphocytes to mercuric chloride. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1986a; 80: 326-328.

Nordlind K, Mutt V. Modulating effects of beta-endorphins, somatostatin, substance PA and vasoactive intestinal peptide on the proliferative response to peripheral blood T lymphocytes of nickel-allergic patients to nickel sulphate. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1986b; 81: 368-370.

Numao T, Agrawal DK. Neuropeptides modulate human eosinophil chemotaxis. *J Immunol* 1992; 149: 3309-3315.

O'Dorisio MS. Biochemical characteristics of receptors for vasoactive intestinal polypeptide in nervous, endocrine and immune systems. *Fed Proc* 1987; 46: 192-195.

O'Dorisio MS, Hermina N, Balcerzak SP, O'Dorisio TM. Vasoactive intestinal polypeptide stimulation of adenylate cyclase in purified human leukocytes. *J Immunol* 1981; 127: 3533-3538.

O'Dorisio MS, O'Dorisio T, Cotland S, Bakerzak SP. Vasoactive intestinal polypeptide as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med* 1985; 96: 666-672.

O'Dorisio MS, Shannon BT, Fleshman DJ, Campolito LB. Identification of high affinity receptors for vasoactive intestinal peptide on human lymphocytes. *J Immunol* 1989; 142: 3533-3536.

Opendakker G, Van Damme J. Cytokine-regulated proteasas in autoimmune diseases. *Immunology Today* 1994; 15: 103-107.

Ortega E, Barriga C, De la Fuente M. Aging and the non-specific immune response. En: Albaréde JL, Vellas P (eds). *Facts and research in gerontology*. Paris: L'Anné Gérontologique, Serdi 1993: 23-29.

Ortega E, Galán M, De la Fuente M, Barriga C. Influence of physical activity stress and age on the ADCC of lymphocytes from mice. *Arch Gerontol Geriatr* 1993; 16: 93-101.

Ottaway CA. In vitro alterations of receptors for vasoactive intestinal peptide changes the in vivo localization of mouse T cells. *J Exp Med* 1984; 160: 1054-1057.

Ottaway CA, Greenberg GR. Interaction of vasoactive intestinal peptide with mouse lymphocytes: specific binding and modulation of mitogen responses. *J Immunol* 1984; 132: 417-423.

Owens T, Renno T, Taupin V, Krakowski M. Inflammatory cytokines in the brain: Does the CNS shape immune responses?. *Immunology Today* 1994; 15 (12): 566-571.

Palmlad J, Gyllenhammar H, Lindgren JÅ, Malmsten CL. Effects of leukotrienes and F-Met-Leu-Phe on oxidative metabolism of neutrophils and eosinophils. *J Immunol* 1984; 132: 3041-3045.

Patel KV, Schrey MP. Activation of inositol phospholipid signalling and Ca²⁺ efflux in human breast cancer cells by bombesin. *Cancer Res* 1990; 50: 235-239.

Pavlov IP. *Lectures in conditioned reflexes*. New York; Liveright, 1928.

Pawlikowski M, Stepien H, Kunnert-Radek J, Schally AV. Effect of somatostatin on the proliferation of mouse spleen lymphocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 129: 52-55.

Payan DG, Goetzl EJ. Modulation of lymphocyte function by sensory

neuropeptides. *J Immunol* 1985; 135: 783-786.

Payan DG, Hess CA, Goetzl EJ. Inhibition by somatostatin of the proliferation of T-lymphocytes and molt-4 lymphoblasts. *Cell Immunol* 1984a; 84: 433-438.

Payan DG, Levine JD, Goetzl EJ. Modulation of immunity and hypersensitivity by sensory neuropeptides. *J Immunol* 1984b; 132: 1601-1604.

Picker LJ. Mechanisms of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 1992; 4: 277-286.

Plotkin BJ, Paulson D, Chelich A, Jurak D, Cole J, Kasimos J, Burdick J, Casteel N. Immune responsiveness in a rat model for type II diabetes (Zucker rat, fa/fa): susceptibility to *Candida albicans* infection and leucocyte function. *J Med Microbiol* 1996; 44: 277-283.

Pollack JM, Bloom SR, Hobbs S, Solcia E, Pearse AGE. Distribution of bombesin-like peptide in human gastrointestinal tract. *Lancet* 1976; 1: 1109-1110.

Pollack M, Espinoza AM, Guelde G, Koles NL, Wahl LM, Ohi CA. Lipopolysaccharide (LPS)-specific monoclonal antibodies regulate LPS uptake and LPS-induced tumor necrosis factor- α responses by human monocytes. *J Infect Dis* 1995; 172: 794-804.

Rameshwar P, Gascon P, Ganea D. Immunoregulatory effects of neuropeptides. Stimulation of interleukin-2 production by substance P. *J*

Neuroimmunol 1992; 37: 65-74.

Reibnegger G, Fuchs D, Fuith LC, Hausen A, Werner ER, Werner-Felmayer G, et al. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in malignant disease. *Cancer Det Prev* 1991; 15: 483-489.

Reichlin S. Somatostatin: historical aspects. *Scand J Gastroenterol* 1986; 2: 1-10.

Reuter A, Bernier J, Vrindts-Gevaerts Y, Meulemans-Gathy R, Malaise M, Fiers W, Franchimont P. Production of interferon gamma by peripheral blood mononuclear cells from normal and from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1988; 71: 1411-1416.

Roberts AJ, Panja A, Brolin RE, Ebert EC. Human intraepithelial lymphocytes. Immunomodulation and receptor binding of vasoactive intestinal peptide. *Diges Dis Sci* 1991; 36: 341.

Robberecht P, Abello J, Damien C, De Neef P, Vervisch E, Hooghe R, Christophe. Variable stimulation of adenylate cyclase activity by vasoactive intestinal-like peptide and β -adrenergic agonist in murine T-cell lymphomas of immature, helper, and cytotoxic types. *Immunobiology* 1989; 179: 422-425.

Rola-Peschczynski MR, Bolduc D, Pierre S. The effect of vasoactive intestinal peptide on human natural killer cell function. *J Immunol* 1985; 135: 2569-2573.

Romero R, Sepúlveda W, Kenney JS, et al. Interleukin-6 determination in the

detection of microbial invasion of the amniotic cavity. *Ciba Found Symp* 1992; 167: 205.

Roszman TL, Jackson RJ, Cross MJ, Titus WR, Markesberry WR, Brooks H. Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function. *J Immunol* 1985; 135: 769-772.

Roth KA, Evans CJ, Lorenz RG, Weber E, Barchas JD, Chang J-K. Identification of gastrin releasing peptide-related substances in guinea pig and rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 112: 528-531.

Ruff MR, Martin BM, Ginns EI, Farrar WL, Pert CB. CD4 receptor binding peptides that block HIV infectivity cause human monocyte chemotaxis. Relationship to vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett* 1987; 211: 17-21.

Ruff M, Schiffmann E, Terranova V, Pert CB. Neuropeptides are chemoattractants for human tumor cells and monocytes: a possible mechanism for metastasis. *Clin Immunol and Immunopathol* 1985; 37: 387-396.

Sacerdote P, Bianchi M, Penarai AE. Human monocyte chemotactic activity of calcitonin and somatostatin-related peptides: modulation by chronic peptide treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 141-146.

Samsonov M, Fuchs D, Reibnegger G, Belenkov JN, Nasonov EL, Wachter H. Patterns of serological markers for cellular immune activation in patients with dilated cardiomyopathy and chronic myocarditis. *Clin Chem* 1992; 38: 678-680.

Samsonov M, Wachter H, Fuchs D. Serum-soluble interleukin-2 receptor, neopterin levels, and severity of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1996; 93: 1255-1256.

Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 1987; 237: 1171-1176.

Scarborough DE, Lee SL, Dinarello CA, Reichlin S. Interleukin-1beta stimulates somatostatin biosynthesis in primary cultures of fetal rat brain. *Endocrinology* 1989; 124: 549-551.

Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SP, Mathison JC, Tobias PS, Ulevicht RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249: 1429-1431.

Scicchitano R, Dazin P, Biennenstock J, Payan DG, Stanis AM. Distribution of somatostatin receptors on murine spleen and Peyer's patch T and B lymphocytes. *Brain, Behaviour and Immunity* 1987; 1: 173-184.

Segura JJ, Guerrero JM, Goberna R, Calvo JR. Characterization of functional receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) in rat peritoneal macrophages. *Reg Pept* 1991; 33: 133-143.

Segura JJ, Guerrero JM, Goberna R, Calvo JR. Stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on cyclic AMP production in rat peritoneal macrophages. *Reg Peptides* 1992; 37: 195-203.

Selye H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Brain J Exp Pathol* 1936; 17: 234-238.

Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor- α and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1991; 325: 467-472.

Shaw C, Thim L, Conlon JM. Primary structure and tissue distribution of guinea pig gastrin-releasing peptide. *J Neurochem* 1987; 49: 1348-1354.

Sher A, Coffman RL, Heiny S, P Scott, Cheever AW. Interleukin-5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 61-74.

Sirianni MC, 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* 1992; 38: 79-87.

Soder O, Hellstrom P. Neuropeptide regulation of human thymocyte, guinea pig T lymphocyte and rat B lymphocyte mitogenesis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 84: 205-209.

Solana R, Villanueva JL, Peña J, De la Fuente M. Cell mediated immunity in ageing. *Comp Biochem Physiol* 1991; 99A: 1-4.

Solt VB, Braum MR, Kennedy B, Kolterman OG, Ziegler MG. Elevated insulin,

norepinephrine and neuropeptide Y in hypertension. *Am J Hypertens* 1990; 3: 823-828.

Song L, Kim YH, Chopra RK, Proust JJ, Nagel JE, Nordin AA, Adler WH. Age-related effects in T cells activation and proliferation. *Exp Gerontol* 1993; 28: 313-321.

Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, McLeod RM. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* 1989; 125: 575-577.

Staley J, Coy DH, Jensen RT, Moody TW. Solubilization and purification of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors from human cell lines. *J Mol Neurosci* 1993; 4: 39-39.

Stanisz AM, Befus AD, 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* 1986; 136: 152.

Stanisz AM, Scichitano R, Dazin P, Biennenstock J, Payan DG. Distribution of substance P receptors on murine spleen and Peyer's patches T and B cells. *J Immunol* 1987; 139: 749-754.

Stead RH, Biennestock J, Stanisz HM. Neuropeptide regulation of mucosal immunity. *Immunol Rew* 1987; 100: 333-359.

Stefano GB, Paemen LR, Hughes TK Jr. Autoimmunoregulation: differential

modulation of CD 10/neutral endopeptidase 24.11 by tumor necrosis factor and neuropeptides. *J Neuroimmunol* 1992; 41: 9-14.

Stern MP, Patterson JK, Mitchell BD, Haffner SM, Hazuda HP Overweight and mortality in Mexican Americans. *Int J Obes* 1990; 14: 623-629.

Strieter RM, Remick DG, Ham JM, Colletti LM, Lynch JP III, Kunkel SL. Tumor necrosis factor-alpha gene expression in human whole blood. *J Leukocyte Biol* 1990; 47: 366-370.

Sun L, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide inhibits interleukin (IL)-2 and IL-4 production through different molecular mechanisms in T cells activated via the T cell receptor/CD3 complex. *J Neuroimmunol* 1993; 48: 59-70.

Tache Y, Pittman Q, Brown M. Bombesin-induced poikilothermia in rats. *Brain Res* 1980; 188: 525-530.

Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; 13: 151-153.

Tatemoto K. Neuropeptide Y: Complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 5485-5489.

Theodorsson-Norheim E, Hensen E, Lundberg JM. Radioimmunoassay for neuropeptide (NPY): chromatographic characterization of immunoreactivity in plasma and tissue extracts. *Scand J Lab Invest* 1985; 45: 355-365.

Thiel M, Chouker A. Acting via A2 receptors, adenosine inhibits the production of tumor necrosis factor-alpha of endotoxin-stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med* 1995; 126: 275-282.

Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein and CD14 in LPs dependent macrophage activation. *Immunobiology* 1993; 187: 227-232.

Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. Cachectin/tumour necrosis factor. *Lancet* 1989; 20: 1122-1125.

Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 1994; 45: 491-502.

Uehara A, Gillis S, Arimura A. Effect of interleukin-1 on hormone release from normal rat pituitary cells in primary culture. *Neuroendocrinology* 1987; 45: 343-347.

Ulevitch RJ. Recognition of bacterial endotoxins by receptor-dependent mechanisms. *Adv Immunol* 1993; 53: 267-289.

Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 125-130.

Van Der Meer JWM. The influence of culture conditions and serum lipids on interleukin-1 production by human monocytes. *J Immunol* 1988; 135: 1132-1136.

Verhagen J, Bruynzeel PLB, Koedam JA, Wassink GA, de Boer M, Terpstra GK, Kreukniet J, Veldink GA, Vliegenhart JFG. Specific leukotriene formation by purified human eosinophils and neutrophils. *FEBS Lett* 1984; 168: 23-28.

Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER. Neopterin as a marker for activation of cellular immunity: immunological basis and clinical application. *Adv Clin Chem* 1989; 27: 81-141.

Waeber B. Neuropeptide Y: a missing link?. *Hospital Practice* 1990; 15: 101-120.

Wahlestedt C, Grundemar L, Håkanson R, Heilig M, Shen GH, Zukowska-Grojec Z, Reis DJ. Neuropeptide receptor subtypes Y1 and Y2. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 611: 7-10.

Wahlestedt C, Regunathan S, Reis DJ. Identification of cultured cells selectively expressing Y1-, Y2-, or Y3-type receptors for neuropeptide Y/peptide YY. *Life Sci* 1992; 50: 7-12.

Wahlestedt C, Yanaihava N, Hakanson R. Evidence for difference pre and postjunctional receptors for Neuropeptide Y and related peptides. *Reg Pept* 1986; 13: 307-318.

Walker P, Grouzmann E, Burnier M, Waeber B. The role of neuropeptide Y in cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 111-115.

Walton PE, Cronin MJ. Tumor necrosis factor-alpha inhibits growth hormone

secretion from cultured anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1989; 125 (2): 925-929.

Webber RH, DeFelice R, Ferguson RJ, Powell JP. Bone marrow response to stimulation of the sympathetic trunk in rats. *Acta Anat* 1970; 77: 92-95.

Weber S, Zuckerman JE, Bostwick DG, Bensch KG, Sikic BI, Rafin TA. Gastrin releasin peptide is a selective mitogen for small cell lung carcinoma in vitro. *J Clin Invest* 1985; 75: 306-309.

Weigent DA, Carr JJ, Blalock JE. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors?. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 579: 17-27.

Weinstock JV, Blum A, Khetarpal S. Granulomas in murine schistosomiasis mansoni contain vasoactive intestinal peptide-responsive lymphocytes. *Cell Immunol* 1991; 134: 458-462.

Weinstock JV, Blum A, Walder J, Walder R. Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansoni produce substance P. *J Immunol* 1988; 141: 961-963.

Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Yim JJ, et al. Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1, and T24 cells. GTP cyclohydrolase I is stimulated by interferon gamma, and 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthetase and sepiapterin reductase are constitutively present. *J Biol Chem* 1990; 265: 3189-3192.

Westendorf JM, Schonbrunn A. Bombesin stimulates prolactin and growth hormone release by pituitary cells in culture. *Endocrinology* 1982; 110: 352-358.

Willey JC, Lechner JF, Harris CC. Bombesin and C-terminal tetradecapeptide of gastrin-releasing peptide are growth factors for normal human bronchial epithelial cells. *Exp Cell Res* 1984; 153: 245-248.

Williams JD, Czop JK, Austen KF. Release of leukotrienes by human monocytes on stimulation of their phagocytic receptor for particulate activators. *J Immunol* 1984; 132: 3034-3040.

Winzen R, Wallach D, Engelmann H, Nophar Y, Brakebusch C, Kemper O, Resch K, Holtmann H. Selective decrease in cell surface expression and mRNA level of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor during differentiation of HL-60 cells into macrophage-like but not granulocyte-like cells. *J Immunol* 1992; 148: 3454-

Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A. Cachectin TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* 1988; 240: 1546-1548.

World Health Organization Expert Committee (1980). Second Report on Diabetes Mellitus. Geneva, WHO. Tech. Rep. Ser. no. 646.

Yegen BÇ, Gürbüz V, Coskun T, Bozkurt A, Kurtel H, Alican I, Dockray GJ. Inhibitory effects of gastrin releasing peptide on gastric emptying in rats. *Reg*

Pept 1996; 61: 175-180.

PIES FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Comunicación entre sistemas nervioso, inmune y endocrino.

Figura 2. Niveles de citoquinas en muestras basales y controles.

Figura 3. Producción de citoquinas tras el estímulo con LPS. Comparación con controles.

Figura 4. Producción de IL-1 β tras estimulación con NPY y LPS + NPY.

Figura 5. Producción de IL-1 β tras estimulación con somatostatina y LPS + somatostatina.

Figura 6. Producción de IL-1 β tras estimulación con VIP y LPS + VIP.

Figura 7. Producción de IL-1 β tras estimulación con GRP y LPS + GRP.

Figura 8. Producción de IL-6 tras estimulación con NPY y LPS + NPY.

Figura 9. Producción de IL-6 tras estimulación con somatostatina y LPS + somatostatina.

Figura 10. Producción de IL-6 tras estimulación con VIP y LPS + VIP.

Figura 11. Producción de IL-6 tras estimulación con GRP y LPS + GRP.

Figura 12. Producción de TNF-alfa tras estimulación con NPY y LPS + NPY.

Figura 13. Producción de TNF-alfa tras estimulación con somatostatina y LPS + somatostatina.

Figura 14. Producción de TNF-alfa tras estimulación con VIP y LPS + VIP.

Figura 15. Producción de TNF-alfa tras estimulación con GRP y LPS + GRP.

Figura 16. Producción basal de LB4 tras una incubación de 30 min (controles) y tras la estimulación con LPS.

Figura 17. Producción de LB4 en respuesta al estímulo con NPY.

Comparación con controles.

Figura 18. Producción de LB4 en respuesta al estímulo con somatostatina.

Comparación con controles.

Figura 19. Producción de LB4 en respuesta al estímulo con VIP. Comparación con controles.

Figura 20. Producción de LB4 en respuesta al estímulo con GRP.

Comparación con controles.

Figura 21. Producción basal de neopterinina, tras una incubación de 30 min y después de la estimulación con LPS.

Figura 22. Producción de neopterinina en respuesta al estímulo con NPY.

Comparación con controles.

Figura 23. Producción de neopterinina en respuesta al estímulo con somatostatina. Comparación con controles.

Figura 24. Producción de neopterinina en respuesta al estímulo con VIP.

Comparación con controles.

Figura 25. Producción de neopterinina en respuesta al estímulo con GRP.

Comparación con controles.

Tabla I. Tipos de citoquinas.

Tabla II. Efectos principales de la IL β , IL-6 y TNF-alfa.

Tabla III. Edad y sexo.

Tabla IV. Características antropométricas de los ancianos sanos.

Tabla V. Características antropométricas de los pacientes diabéticos.

Tabla VI. Datos bioquímicos de los ancianos sanos.

Tabla VII. Datos bioquímicos de los pacientes diabéticos.

Tabla VIII. Producción espontánea de citoquinas en leucocitos totales de sangre periférica.

Tabla IX. Producción de IL-1 β en respuesta al estímulo con LPS y diversos neuropéptidos.

Tabla X. Producción de IL-6 en respuesta al estímulo con LPS y diversos neuropéptidos.

Tabla XI. Producción de TNF-alfa en respuesta al estímulo con LPS y diversos neuropéptidos.

Tabla XII. Producción de IL-1 β en respuesta al estímulo combinado de LPS y diversos neuropéptidos.

Tabla XIII. Producción de IL-6 en respuesta al estímulo combinado de LPS y diversos neuropéptidos.

Tabla XIV. Producción de TNF-alfa en respuesta al estímulo combinado de LP y diversos neuropéptidos.

Tabla XV. Producción de IL-1 β tras 4 horas de estimulación con diferentes neuropéptidos.

Tabla XVI. Producción de IL-6 tras 4 horas de estimulación con diferentes neuropéptidos y LPS.

Tabla XVII. Producción de TNF-alfa tras 4 horas de estimulación con diferentes neuropéptidos y LPS.

Tabla XVIII. Síntesis de LB4 en muestras basales, controles y en respuesta a la estimulación con LPS, NPY, somatostatina, VIP y GRP.

Tabla XIX. Producción de neopterina en muestras basales, controles y en respuesta a la estimulación con LPS, NPY, somatostatina, VIP y GRP.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ACTH: hormona corticotropa

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

APUD: captación y descarboxilación de precursores de aminas

CMI: inmunidad mediada por células

Ca: calcio

Con A: concanavalina A

CMB: circunferencia muscular del brazo

CRH: hormona liberadora de corticotropina

DMNID: diabetes mellitus no insulino dependiente.

EDTA: etilén-diamino-tetra-acético

ELISA: enzimo inmunoensayo

G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos

GH: hormona del crecimiento

GM-CSF: factor estimulante de las colonias de granulocitos-monocitos

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

GTP: guanidín-trifosfato

GRP: péptido liberador de gastrina

HBsAg: antígeno de superficie de la hepatitis B

HPETE: hidroxiperoxi-eicosa-tetranoico

ICC: índice cintura cadera

Ig: inmunoglobulina

IFN: interferón

IL: interleuquina

IL-Rs: receptores de interleuquina

IMC: índice de masa corporal

KDa: kilodaltons

Kg: kilogramo

L: litro
LB4: leucotrieno B4
LH: hormona luteinizante
LPS: lipopolisacárido
m: metro
M: molar
M-CSF: factor estimulador de colonias de mielocitos
mL: mililitro
mmol: milimol
mRNA: ácido ribonucleico mensajero
NKA: neuroquinina A
NPY: neuropéptido Y
OMS: Organización Mundial de la Salud
PCT: perímetro cutáneo tricipital
PG: prostaglandina
PHA: Fitohemaglutinina
pmol: picomol
PRL: prolactina
RPM: revoluciones por minuto
SCLC: carcinoma pulmonar de células pequeñas
SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC: sistema nervioso central
TNF: factor de necrosis tumoral
TSH: hormona tireotropa
VIP: péptido intestinal vasoactivo