

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Farmacología y Toxicología



**Inmunodepresión en situaciones de estrés experimental y
morfinodependencia: su modulación farmacológica**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

José María Pórtoles Pérez

Director

Pedro Lorenzo Fernández

Madrid 2004

ISBN: 978-84-8466-973-9

© José María Pórtoles Pérez, 1992

JOSE M^a PORTOLES PEREZ

INMUNODEPRESION EN SITUACIONES DE ESTRES EXPERIMENTAL Y
MORFINODEPENDENCIA: SU MODULACION FARMACOLOGICA

Director: Prof. Pedro Lorenzo Fernández

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

1992

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

PEDRO LORENZO FERNANDEZ CATEDRATICO DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

TIENE A BIEN INFORMAR:

Que el Proyecto de trabajo preentado por el Doctorando D. JOSE MARIA PORTOLES PEREZ, titulado: "Inmunodpresión en situaciones de estrés experimental y morfinoddependencia: su modulación farmacológica", reúne las condiciones académicas y científicas necesarias para considerarlo como Tesis Doctoral.

Madrid, 23 de Octubre de 1992

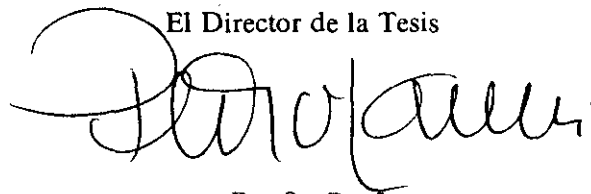
V.º B.º
EL TUTOR (2)

Fdo.: _____

(fecha y firma)

N.I.F.:

El Director de la Tesis



Fdo.: Prof. P. Lorenzo

(fecha y firma)

N.I.F.: 11.010.154 P

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

EL CONSEJO DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

INFORMA:

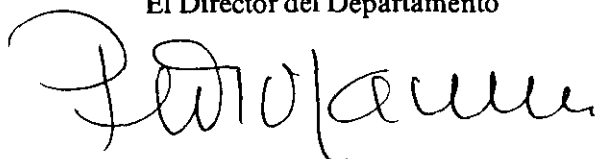
Favorablemente la presentación, exposición y defensa del Proyecto de trabajo presentado por D. JOSE MARIA PORTOLES PEREZ y dirigida por el Prof. Pedro Lorenzo Fernández, Catedrático de este Departamento, dado que reúne las condiciones académicas y científicas requeridas para ser considerado como Tesis Doctoral.

Madrid, 29 Octubre de 1992

Fecha reunión
Consejo Departamento

27/10/92

El Director del Departamento



Fdo.: Prof. P. Lorenzo

(fecha y firma)

I. INTRODUCCION.

I.1.- ORGANIZACION ANATOMICA DEL ESTRES.

I.2.- SIGNIFICACION BIOLOGICA DEL ESTRES.

I.2.1.- Cuadros de estrés de origen sistémico.

A) Estrés por shock térmico.

B) Estrés biológico por interacciones huésped-parásito.

C) Estrés psiconeurógeno y mecanismos de adaptación.

I.3.- EFECTOS DEL ESTRES SOBRE LA INTERACCION NEUROINMUNE.

I.3.1.- Modificación de respuestas inmunitarias en estados de ansiedad.

I.3.2.- Sistemas monoaminérgicos, estrés y respuesta inmune.

I.3.3.- Neuropeptidos opioides y respuesta inmune en situaciones de estrés.

I.4.- NEUROINMUNOMODULACION EN CUADROS DE HIPERSENSIBILIDAD Y ANAFILAXIA. SU VARIACION EN SITUACIONES DE ESTRES.

I.5.- MODIFICACIONES FARMACOLOGICAS DE LA INTERACCION NEUROINMUNE EN CUADROS DE ANAFILAXIA.

I.6.- SOBRE LAS POSIBILIDADES DE MODELOS EXPERIMENTALES ADECUADOS.

I.6.1.- En relación con ciertos patrones de condicionamiento y aprendizaje.

I.6.2.- En relación con los cuadros de anafilaxia.

II. OBJETIVOS DEL TRABAJO.

III. MATERIALES Y METODOS.

III.1.- MATERIALES Y MEDIOS.

III.1.1.- Animales.

III.1.2.- Cultivos celulares.

- III.1.3.- Antígenos.
- III.1.4.- Anticuerpos sensibilizantes.
- III.1.5.- Anticuerpos para citofluorometría.
- III.1.6.- Medios de cultivo y soluciones.
- III.1.7.- Mitógenos y reactivos celulares.
- III.1.8.- Fármacos.

III.2.- TECNICAS Y MODELOS EXPERIMENTALES.

- III.2.1.- Modelos experimentales de estrés.
- III.2.2.- Obtención de sueros anti-Brucella.
- III.2.3.- Determinaciones de inmunoprecipitación cuantitativa.
- III.2.4.- Determinación de proteínas.
- III.2.5.- Determinación de DL₅₀ para moléculas endotóxicas.
- III.2.6.- Anafilaxia sistémica pasiva (PSA), y determinación de TL50.
- III.2.7.- Anafilaxia cutánea pasiva (PSA).
- III.2.8.- Ensayos de transformación linfoblástica.
- III.2.9.- Ensayos de proliferación celular en placa.
- III.2.10.- Determinación de Interleuquina-2 (IL-2).
- III.2.11.- Actividad citotóxica de células NK.
- III.2.12.- Recuento plaquetario.
- III.2.13.- Recuento de eosinófilos.
- III.2.14.- Preparación de células para su utilización en citofluorometría de flujo (FACS).
- III.2.15.- Determinación de niveles de corticosterona en suero.

III.3.- ANALISIS DE LOS RESULTADOS.

IV. RESULTADOS.

IV.1.- ESTUDIO DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES.

IV.1.1.- Modelos de estrés experimental.

IV.1.2.- Modelos de anafilaxia experimental.

IV.1.2.1.- Anafilaxia sistémica pasiva (PSA).

IV.1.2.2.- Anafilaxia cutánea pasiva (PCA).

IV.1.2.3.- Nivel de estrés en los modelos de PSA y PCA

IV.1.2.4.- Perfil inmunológico de la respuesta anafiláctica

IV.2.- RESPUESTA INMUNE EN SITUACIONES DE ESTRES.

IV.2.1.- Perfil inmunofarmacológico en situaciones de estrés.

IV.2.2.- Variaciones de las respuestas anafilácticas en situaciones de estrés.

IV.2.2.1.- Reacciones de PSA anti-endotoxina.

IV.2.2.2.- Reacciones de PCA homólogas.

IV.2.2.3.- Perfil inmunofarmacológico en reacciones de anafilaxia producidas en situaciones de estrés.

IV.3.- MODULACION FARMACOLOGICA DE LA INTERACCION NEUROINMUNITARIA EN SITUACIONES DE ESTRES.

IV.3.1.- Tratamiento con eleuterósidos.

IV.3.2.- Empleo del dietil-dithiocarbamato (DTC).

IV.3.3.- Empleo de anti-histamínicos y anti-serotonínicos.

IV.3.4.- Empleo de antiinflamatorios, antagonistas plaquetarios e inhibidores del complemento

V. DISCUSION.

V.1.- DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS.

V.2.- ALTERACIONES INMUNOLOGICAS PROVOCADAS POR EL MODELO DE INMOVILIZACION.

V.3.- VARIACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE EN RATONES SOMETIDOS A SITUACIONES DE ESTRES POR MORFINODEPENDENCIA.

V.4.- MODULACION FARMACOLOGICA.

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

VII. BIBLIOGRAFIA.

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo
ACTH: Hormona adenocorticotropa
ADN: Acido desoxirribonucleico
ADX: Adrenalectomía
Ag: Antígeno
Af: Acido flufenámico
AIS: Modelo de aislamiento
AMP_c: Adenílico cíclico
ARAS: Sistema reticular activador ascendente
ARG: Arginina
ARN: Acido ribonucleico
BSA: Albúmina de suero bovino
C3_a: Factor 3 del sistema de complemento activado
C4_a: Factor 4 del complemento activado
C5_a: Factor 5 del complemento activado
CF: Clorfeniramina
CG: Clromoglicato
CL: Clofibrato
CM: Cimetidina
ConA: Concanavalina A
COR: Corticosterona
cpm: Cuentas por minuto
CR: Corticotropina
CRF: Factor liberador de corticotropina
CY: Ciproheptadina
DL₅₀: Dosis letal 50%
DTC: Dietil-dithiocarbamato
ECF-A: Factor quimiotáctico de eosinófilos
EDTA: Acido etilendinitrilo tetraacético.
EDTX: Endotoxina
FACS: Citofluorometria de flujo
FCS: Suero fetal de ternera
GH: Hormona de crecimiento
GMP_c: Guanidílico cíclico
GPDF: Factor estresante de cobayos
HAC: Modelo de estrés por hacinamiento
HACA: Anafilaxia cutánea adoptiva heteróloga
HBSS: Solución básica de sales (m Hanks)
HEPES: Acido etanosulfónico de hidroxietilpiperacina
HLA: Sistema mayor de histocompatibilidad
HoACA: Anafilaxia cutánea adoptiva homóloga
HSP_s: Proteínas de shock térmico
³H-TdR: Timidina tritiada
 α -IC: α -Imidazol cetoglutarato
Id: Indometacina
IF: Interferon
IgE: Inmunoglobulina E
IgG: Inmunoglobulina G
IL-1: Interleukina 1
IL-2: Interleukina 2

INM: Modelo de inmovilización
kDa: Kilodalton
LFS: Sistema límbico anterior
LMS: Sistema límbico intermedio
LPS: Lipopolisacarido
LT (D₄, B₄): Leucotrienos
MDP: Muramil dipéptido
MFN: Morfina
mRNA: Acido ribonucleico mensajero
 α -MSH: Hormona melanotropa
NCF: Factor quimiotáctico de neutrófilos
NP: Péptido neuroentérico
NPV: Núcleo paraventricular
Nx: Nalaxona
PAF: Factor activador plaquetario
PBS: Solución salina tamponada
PCA: Anafilaxia cutánea pasiva
PGE: Prostaglandina E
PGF: Prostaglandina F
PIV: Péptido intestinal vasoactivo
PL: (HPL) Lactógeno placentario
PQT: Plaquetas
PRL: Prolactina
PRO: Prolina
PSA: Anafilaxia sistémica pasiva
PST_s: Proteínas de shock térmico
RPMI: Medio de cultivo para linfocitos
SLM: Sistema límbico mesencefálico
SLP: Sistema límbico prosencefálico
SNA: Sistema nervioso autónomo
SNC: Sistema nervioso central
SOM: Somatostatina
SP: Sustancia P
SRAA: Sistema reticular activador ascendente
Su: Suramina
Tc: Ticlopidina
TL₅₀: Tiempo letal 50
TP: Tripelenamina
TRH: Hormona tirotrópica
VIP: Péptido intestinal vasoactivo

I. INTRODUCCION.

En opinión de la mayoría de los sociólogos, parecen existir tres condicionantes sociales del comportamiento humano que son característicos en la forma de vida de los habitantes de países desarrollados: una continua aceleración del ritmo de vida, una competitividad creciente en lo profesional, y una vida sedentaria con disminución de la actividad física. Todo ello propicia una mayor frecuencia de cuadros de **estrés psiconeurógeno** o situaciones de ansiedad que alteran el sistema nervioso y, a su vez, dado la comunicación neuro-inmune de carácter bidireccional, pueden perjudicar el normal funcionamiento del sistema inmunitario encargado de mantener un estado de defensa en el organismo.

Se ha comprobado que durante las situaciones de estrés existe una liberación simultánea de encefalinas y catecolaminas junto con hormonas esteroideas. Cuando esta situación se prolonga o repite, aparece un cuadro fisiopatológico en el que se propicia la intervención del metabolismo serotoninérgico. Por otra parte, también es conocido que alteraciones en el metabolismo de la serotonina pueden modificar la respuesta inmune, sobre todo en animales en situación de estrés.

Entre las alteraciones más frecuentes del sistema inmune, se cuentan los cuadros de hipersensibilización, en los que pueden intervenir los sistemas histaminérgico y serotoninérgico. Otras formas de reacción a través del sistema dopaminérgico podrían cerrar el ciclo interactivo de las reacciones neuro-inmuno-endocrinológicas, completando la interacción de los sistemas monoaminérgicos que intervienen en las respuestas de adaptación al medioambiente. Su modulación farmacológica -cuyo estudio se inició hace algunos años en nuestro Departamento- resulta del máximo interés en busca de una mejora de la calidad de vida.

Aunque en las reacciones de hipersensibilidad actúan como mediadores directos la histamina y la serotonina, según se comprueba en cuadros de anafilaxia sistémica en

ratas, ello no excluye que en el fenómeno intervengan también otros moduladores del tipo de neuropéptidos. Se ha descrito un modelo de neurotransmisión histaminérgica en el que hay intervención de péptidos y de los neurotransmisores cerebrales -que tanto participan en las situaciones de **estrés psiconeurógeno**- y también se han encontrado receptores opioides e histaminérgicos-H₂ y H₁ en la superficie de células mediadoras de la respuesta inflamatoria e inmunitaria.

Ante esta situación, ya que las interacciones del sistema nervioso y del sistema inmune en situaciones de anafilaxia, son las menos estudiadas, parece justificado que intentemos aportar nuevos datos al conocimiento del problema, investigando sobre modelos experimentales en los que los distintos sistemas monoaminérgicos son puestos a prueba en situaciones de estrés para, sucesivamente, estudiar su modulación farmacológica desde distintos puntos de vista.

Empezaremos por actualizar datos relativos a la situación biológica del estrés, tanto como a la fisiopatología de la reacción anafiláctica; también completaremos esta introducción al tema con una revisión de los distintos modelos animales que tengan posibilidad de aplicación a este tipo de estudios y finalmente, examinaremos algunos aspectos farmacológicos que puedan afectar a la interacción neuro-inmune.

I.1.- ORGANIZACION ANATOMICA Y RESPUESTAS DE ESTRES.

En relación con los lugares anatómicos comunes del estrés, señalaremos, tanto las aferencias e interconexiones entre los sistemas nervioso central y periférico, como las eferencias de este sistema que regula las respuestas adaptativas al medio. La vía aferente de este mecanismo es muy compleja, ya que multitud de estímulos pueden considerarse desencadenantes de estrés y éstos son conducidos por el sistema nervioso periférico hasta el sistema nervioso central. Es aquí donde se produce una integración de la información

actual y la almacenada; posteriormente, la vía eferente del sistema se encargará de ejecutar la respuesta frente a la nueva situación.

Los estímulos nerviosos que desencadenan esta respuesta pueden ser clasificados, según PACKOVITS y BROWNSTEIN(1985), en tres grupos: a) **estímulos somáticos y viscerales**, que son guiados por fibras nerviosas sensitivas; b) **estímulos de órganos especializados**, que tienen su origen en los sentidos del olfato, vista, gusto, oído y tacto; y c) **estímulos emocionales**, originados y modulados por el sistema límbico.

En cuanto al primer grupo, estímulos de todo tipo alcanzan al hipotálamo por vías multisinápticas, existiendo receptores especializados para el dolor y la temperatura, así como para el tacto. Los estímulos dolorosos, tanto somáticos como viscerales, constituyen un importante grupo de activación del mecanismo del estrés, pero podemos aceptar que la estimulación intensa de los receptores mecánicos, térmicos y químicos, así como la estimulación bajo condiciones especiales de receptores táctiles sensibles a la presión y equilibrio (propioceptivos y cinestésicos), pueden desarrollar también una situación de estrés. La organización anatómica de estas vías de información se divide en dos grandes grupos: i) aferencias procedentes de los pares craneales; y ii) aferencias procedentes del resto del cuerpo que acceden por la vía medular.

Los pares craneales implicados en estas respuestas son, en el ser humano: el trigémino (sensibilidad de la cara), el facial, el glossofaríngeo y el hipogloso; éstos se continúan por el tracto trigémino-espinal hasta los núcleos correspondientes en el tronco encefálico. Desde allí, la segunda neurona se une con las procedentes del tracto espinotalámico que conectan con el tálamo.

Existen dos vías aferentes medulares fundamentales: a) la vía lemniscal, que conduce la información del tacto fino de carácter epicrítico o discriminativo, como la presión o la vibración, y la cinestésica; y b) la vía extralemniscal, que conduce la información dolorosa y de temperatura, y que es de carácter protopático. La vía lemniscal comienza

en los receptores (especializados o no) con localización periférica y que se continúan hasta la médula, donde integran el cordón posterior que asciende unilateralmente hasta alcanzar los núcleos de Goll y Burdach, donde se encuentran los núcleos celulares. Desde ahí parte la segunda neurona que se decusa a nivel bulbar, alcanzando por medio del lemnisco medial el tálamo ventro-basal; las neuronas allí originadas se proyectan hacia la corteza cerebral somestésica, donde se hallan los núcleos de la tercera neurona de esta vía.

En cuanto a la vía extralemniscal, está constituida por vías neuronales más lentas y menos discriminadoras. Los axones neuronales se cruzan en cada nivel medular, incorporándose a las láminas I y II del asta posterior de la médula; desde allí, parte la segunda neurona que asciende por el fascículo espinotalámico contralateral hasta el tálamo posterior.

Entre las vías que conducen las sensaciones captadas por los sentidos básicos cabe distinguir las sensaciones captadas por el ojo, que pueden alcanzar el hipotálamo por *vía supraquiasmática a través del cuerpo geniculado lateral*; o también, se puede transmitir esta información directamente por el quiasma, las cintillas ópticas, las radiaciones ópticas y alcanzar el córtex occipital; la información allí analizada se transmite a las estructuras reguladoras del estrés, según veremos más adelante. La vía auditiva, puede alcanzar el hipotálamo por el lemnisco lateral. El sentido del gusto, recogido por los pares craneales VII, X y XII, alcanza el núcleo del tracto solitario y posteriormente el núcleo parabraquial en el puente; desde allí, las fibras se dirigen hacia el tálamo y posteriormente al córtex y al núcleo paraventricular. El olfato, alcanza directamente el córtex olfatorio y desde allí, a través de la amígdala ventral y el subiculum, alcanza el hipotálamo.

En relación con las interacciones entre el sistema límbico y el hipotálamo, debemos comenzar diciendo que el sistema límbico se halla -más o menos desarrollado- en todas las especies de mamíferos y, de hecho, se han publicado diversas experiencias que

demuestran la relación existente entre estas dos estructuras. Así se ha visto que la estimulación eléctrica de estructuras límbicas, como son el septo, la amígdala o el hipocampo, van seguidas de una elevación en los niveles de corticosterona en plasma; en tanto que la destrucción de las estructuras hipotalámicas, anula este efecto, demostrando claramente la interacción entre estas estructuras (FELDMAN y col.,1982).

Asimismo, se han localizado vías anatómicas que relacionan directamente las estructuras límbicas principales con el hipotálamo; la amígdala conecta con el núcleo paraventricular (NPV) por vía de la *stria terminalis* o con una sinapsis previa en los núcleos de dicha estria. Axones procedentes del hipocampo y del subiculum alcanzan el NPV a través del tracto córtico-hipotalámico.

El sistema límbico constituye la estructura esencial de toda esta integración. Dicho sistema se halla integrado dentro del cerebro del paleomamífero, en estrecha relación con el rinencéfalo o cerebro reptiliano. Constituye una estructura en forma de anillo, que se dispone en torno al tronco cerebral, con otros elementos diencefálicos profundos rodeados, a su vez, por el cerebro del neomamífero o neocórtex. Dentro de éste, distinguimos el **sistema límbico mesencefálico SLM** (limbic midbrain system LMS) y el **sistema límbico proencefálico SLP** (limbic forebrain system LFS). El primero -SLM- se halla en conexión con la sustancia reticular activadora ascendente (SRAA) y tiene como función alertar a todo el organismo; no se trata de una reacción agresiva, sino de una situación de alerta y atención. El SLP es el encargado de evaluar la situación y elegir la respuesta más adecuada y para ello dispone de múltiples interconexiones. En primer lugar, unos tractos neuronales le conectan con el córtex temporal (SOLOKOV, 1968) recibiendo aferencias directas monosinápticas desde los bancos de memoria, lo que le permite comparar la información acumulada con la correspondiente a los nuevos estímulos. Las conexiones con el lóbulo frontal aportan los patrones de comportamiento e integran

la información sensitivo-motora; desde este punto de vista, algunos autores consideran al lóbulo frontal como parte del sistema límbico.

Una vez integrada toda la información, el individuo toma una actitud que, en su forma más simple, puede ser de ataque o defensa (en cuya respuesta la amígdala juega un papel importante); o también, el organismo puede adoptar una respuesta más compleja. La reacción elegida es muy variable, en general es similar a la elegida en otra situación semejante que se haya producido previamente; si esta respuesta es adecuada, se extingue la situación de alerta y el consiguiente estrés; pero si no lo es, la situación de tensión persiste (LEVINE y col.,1978). Puede producirse una situación completamente nueva, en

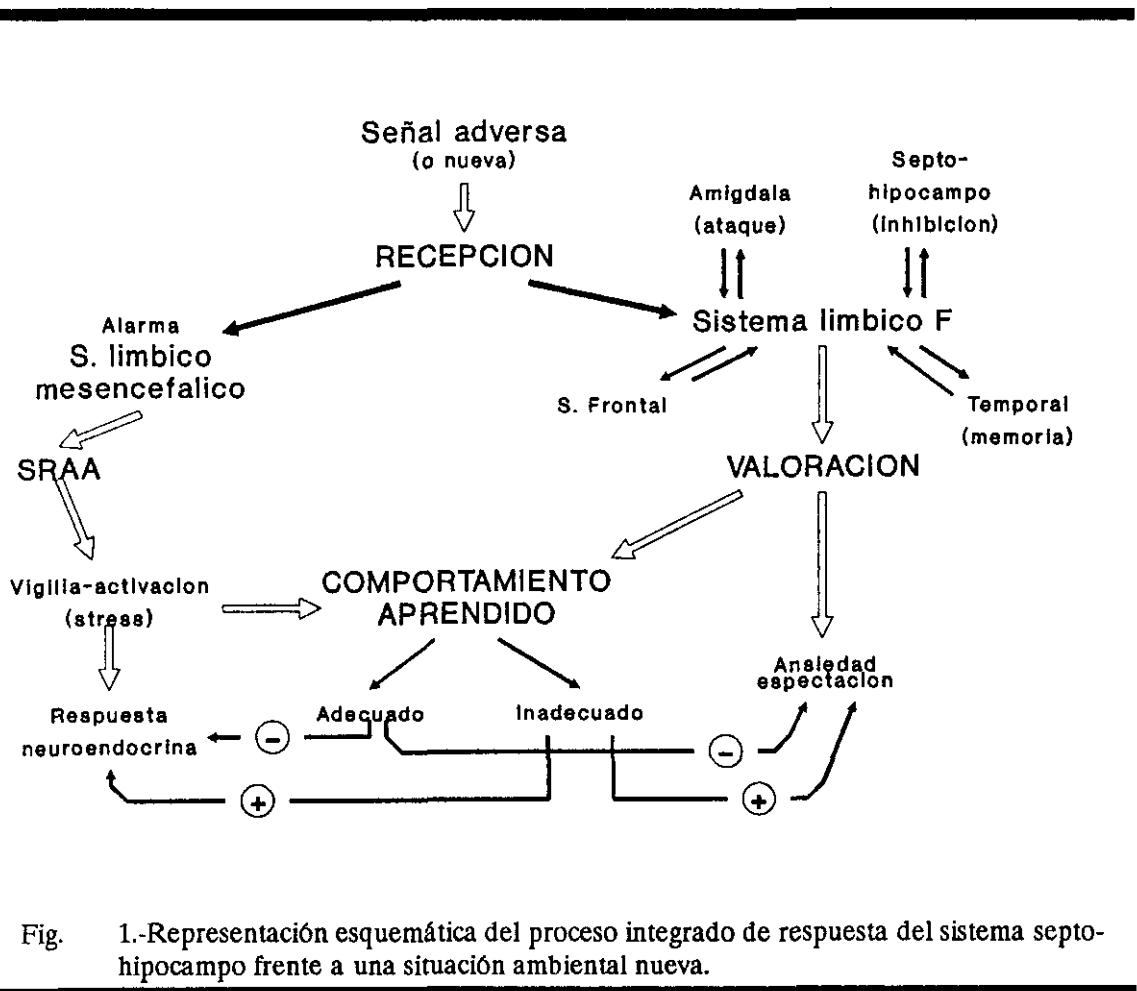


Fig. 1.-Representación esquemática del proceso integrado de respuesta del sistema septo-hipocampo frente a una situación ambiental nueva.

la que el individuo no sabe reaccionar y se origina entonces un fenómeno de inhibición del comportamiento, con lo que se encuentra en una situación de máximo estrés en la que mantiene todas las defensas preparadas, y con un nivel de ansiedad máximo acompañada de una sensación de desamparo, si es que puede admitirse este sentimiento en los mamíferos inferiores (GRAY, 1982). El sistema septo-hipocámpico es esencial en este tipo de reacciones. En la Fig. 1 se representa de un modo integrado todo el proceso hasta aquí descrito.

Por otra parte, también consideramos oportuno resumir en la Fig. 2 las interacciones a nivel de SNC de un roedor, con indicación de los neurotransmisores implicados en determinadas vías. Este esquema nos permite representar mejor las dianas de los sistemas monoaminérgicos y la intervención de algunos fármacos.

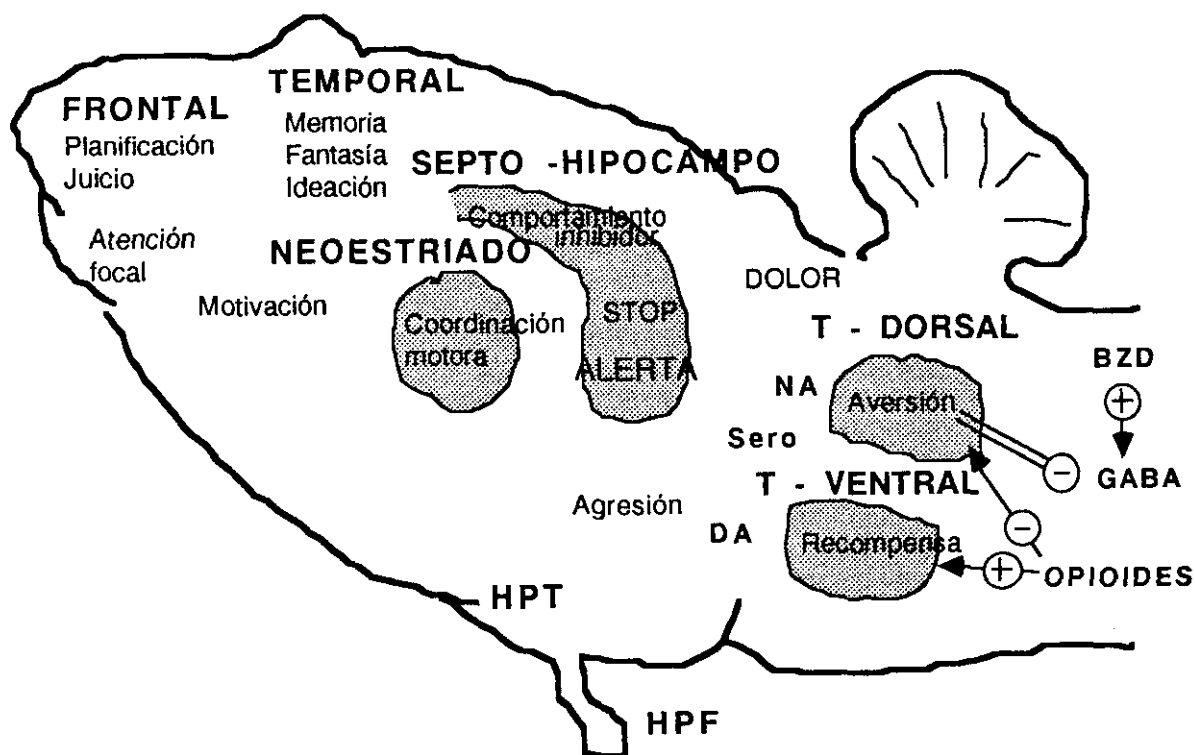


Fig. 1.-Esquema que relaciona diferentes zonas de la anatomía del SNC murino con su función principal, indicando los neurotransmisores implicados en cada caso.

Por último, en cuanto a la vía eferente de este complicado sistema neuro-humoral, se articula sobre el eje hipotálamo-hipofiso-adrenal, y sobre respuestas mediadas directamente por el sistema nervioso autónomo. La regulación del control de ACTH se realiza por una doble vía endocrina y nerviosa (FORTIER, 1951) y, más recientemente, se admite una doble vía para el acceso de los estímulos productores de estrés a nivel neuronal en las células liberadoras del factor estimulador de corticotropinas, o células CRF-érgicas: la sistémica y la local. Estas células CRF-érgicas se distribuyen por todo el SNC, pero se concentran principalmente en la parte medial y rostral del núcleo paraventricular del hipotálamo. Este grupo celular es el implicado en la regulación de la hipófisis. El factor estimulador de la liberación de corticotropinas (CRF), se produce en el núcleo paraventricular (NPV) y se acumula en las terminales de la eminencia media, alcanzando concentraciones 50 a 100 veces superiores; desde allí, se libera al sistema venoso portal que comunica el hipotálamo con la hipófisis. El estrés puede actuar a nivel local aumentando la producción de CRF y su concentración en la eminencia media, o cambiando la sensibilidad de los receptores CRF-érgicos.

El CRF liberado, alcanza a través del sistema portal hipofisario -que comienza y acaba en capilares venosos-, las células productoras de ACTH, que disponen de un receptor específico en su membrana. Una vez producida la unión, este complejo CRF-receptor se internaliza en la célula provocando la liberación de ACTH y el aumento de su producción.

Existen otras sustancias implicadas en la comunicación hipotálamo-hipofisaria, como son la vasopresina, la oxitocina, la angiotensina-2, el PIV, y otras aminas biógenas. Todas estas sustancias actúan aumentando la liberación de ACTH, ya sea directamente o como neurotransmisores; o bien, a través del CRF, aumentando su concentración en los capilares venosos.

Una vez recordadas las vías anatómicas que canalizan la información aferente hacia el SNC, revisaremos las interacciones que, a nivel del SNC, consiguen realizar un análisis de cualquier situación dada en el medioambiente, para elaborar una respuesta adecuada ante un cambio de las condiciones del medio o una agresión determinada. Por tanto, cabe decir que *la reacción de estrés constituye la parte inicial de la respuesta, que se produce por la interacción de la información recibida por las vías antes citadas, con los datos acumulados por el aprendizaje previo en el lóbulo temporal, las pautas de comportamiento diseñadas en el córtex frontal y la respuesta voluntaria condicionada en el sistema motor o mediante una respuesta somática condicionada por el sistema nervioso autónomo y el neuroendocrino.*

I.2.- SIGNIFICACION BIOLOGICA DEL ESTRES.

Todos los organismos, ya sean procariontes o eucariontes, han de enfrentarse al medio ambiente para sobrevivir y han de responder, a veces, a estímulos potencialmente dañinos o perjudiciales, creándose así una situación de estrés. Sobre la base de la variable naturaleza del agente estimulador o estresante, ALLEN y col. (1973) distinguen entre cuadros de **estrés de origen sistémico** y cuadros de **estrés de origen neural**. Entre los primeros cabe señalar a los agentes físicos (térmico, sónico o lumínico), a los agentes químicos (liberación de radicales oxidantes, etanol, metales pesados y otras moléculas tóxicas), y a los agentes biológicos (privación de nutrientes, disrupción metabólica, anoxia celular e infecciones). El **estrés neuropsicógeno**, sin embargo, aunque puede ir acompañado de modificaciones fisiológicas a nivel hormonal depende fundamentalmente de la plasticidad neural en respuesta a estímulos medioambientales de carácter psicosocial.

Mientras que los agentes que producen **estrés sistémico o fisiológico** pueden actuar directamente sobre células ACTH de la pituitaria o bien mantener su acción mediatizada

por factores hipotalámicos; sin embargo, en los cuadros de **estrés neurológico**, la liberación de ACTH se produce tan solo por estimulación a partir del hipotálamo.

Según el nivel de organización en la escala biológica, y dependiendo del agente estimulador, en toda respuesta derivada de una situación de estrés entran en juego una serie de proteínas específicas, péptidos u hormonas con los que se pretende mantener invariable la homeostasis de cada ser vivo. En general, cabe afirmar que tanto las células procariotas como las eucariotas, siempre responden a un rango variable de tipos de **estrés somático**, desde el shock térmico hasta una interrupción metabólica (o, por una escasez de nutrientes), con la síntesis de distintas proteínas que se encargan de proteger a la célula de los efectos deletéreos de una situación dañina por estrés. Mediante estas especiales proteínas se facilita a la célula la reestructuración de alguna de sus propias proteínas que se hayan desnaturalizado en la situación adversa.

I.2.1. Cuadros de estrés de origen sistémico.

Con propósito de actualizar el tema desde distintos puntos de vista, es posible diferenciar tres situaciones de **estrés fisiológico**, según se relacione con el shock térmico (LINDQUIST, 1986), con la patología de infecciones (OPERMANN y col.,1981), o con el síndrome general de adaptación que depende del sistema nervioso central (SMELIK, 1987).

A) Estrés por shock térmico.

Cuando un tejido celular, un tejido explantado o un organismo completo queda expuesto durante un cierto tiempo -que es variable según las condiciones experimentales- a un aumento de temperatura, surge una respuesta de carácter universal frente al **estrés térmico** producido. Esta respuesta se traduce por la síntesis de un pequeño número de proteínas cuidadosamente conservadas durante la filogenia (CRAIG, 1985; LINDQUIST y

CRAIG, 1988). Dichas proteínas parecen tener funciones protectoras de carácter general e intervienen en el crecimiento y desarrollo normales para mantener la homeostasis del organismo, conociéndose bajo la denominación genérica de **proteínas de shock térmico PST** (HSP = hot-shock proteins). Dichas PSTs existen en todos los organismos en los que se ha investigado su presencia, tanto desde archibacterias a eubacterias como desde plantas a animales.

En cuanto a la inducción de estas PSTs, varía en función de cada organismo y sus condiciones medioambientales. Así en células de *Drosophila*, que crecen normalmente a 25° C, la aparición de proteínas de estrés térmico se revela a los cuatro minutos cuando la temperatura se eleva de 29° a 38° C, que es comúnmente su temperatura estival (LINDQUIST, 1980); sin embargo, en bacterias termófilas, que crecen habitualmente a 50° C, las proteínas se inducen cuando se alcanzan los 60° C (DANIELS y col.,1984). En peces del ártico, que viven a 0°, se inducen las PSTs a temperaturas de 5° a 10° C; en tanto que en el salmón o la trucha, el máximo de respuesta de las PSTs se observa a los 28° C, aproximadamente (KOTHARY y CANDIDO, 1982). Se ha demostrado la inducción de PSTs en mamíferos durante los estados febriles elevados (LI y LASZLO, 1985a), y este fenómeno es particularmente interesante, en el caso de patógenos procariotas o eucariotas que tienen ciclos celulares dimórficos en los que soportan temperaturas relativamente frías en una de las fases de su ciclo vital y temperaturas más cálidas en su fase parásita dentro del mamífero huésped. Este cambio va siempre acompañado de la inducción de una PST como signo de su adaptación termorresistente.

En general, según datos de la revisión de LINDQUIST (1986), se ha comprobado que en organismos que crecen en un rango restringido de temperaturas, basta superar 5° C por encima del óptimo de su temperatura habitual para que se produzca la respuesta máxima; sin embargo, organismos con un amplio dintel térmico en su hábitat, precisan una elevación súbita de 10° a 15° C sobre su temperatura habitual.

Al observar que otras muchas agresiones celulares, distintas de las térmicas, eran capaces de originar PSTs, se llegó a proponer el término de "**proteínas de estrés**". Hace pocos años, se demostró que muchas de estas proteínas estaban presentes y activas en células normales, y que en ellas realizaban importantes funciones fisiológicas; a partir de entonces, se las comenzó a denominar "**protectores moleculares**" (molecular chaperones) al tener en cuenta su papel más generalizado como proteínas protectoras o de mantenimiento en la célula (ELLIS, 1987; PELHAM, 1988).

En el caso particular del shock térmico, la inducción de las proteínas coincide con la adquisición de tolerancia a temperaturas más extremas, aunque existe la creencia de que en la termotolerancia podrían intervenir también otros mecanismos (LINDQUIST, 1986), puesto que hay casos y circunstancias en los que la inducción de termotolerancia no se correlaciona exactamente con la aparición de las PSTs. Estudios de este tipo se han realizado, bajo muy diferentes condiciones, con células de mamífero (LI, 1983; LI y LASZLO, 1985; LI y WERB, 1982) e incluso con ratones vivos (LI y col., 1983). Un sencillo experimento de letalidad termo-inducida demuestra la participación de las PSTs en la protección frente a temperaturas elevadas. Basta establecer dos lotes iguales de cultivos celulares u organismos sobre los que ensayar el fenómeno: uno de los grupos se somete a una temperatura extrema y se mide la cinética de la letalidad; en el otro grupo, se induce la síntesis de PSTs sometiéndolo a una moderada elevación de temperatura para, después, someter a dicho grupo a las condiciones extremas del primero, con el fin de valorar -en análogas condiciones- la cinética de la termo-letalidad. De este modo se comprueba si existe o no un significativo incremento en la supervivencia de los animales. Esta cinética de inducción de termotolerancia coincide con la cinética de síntesis de PSTs y alcanza su máximo cuando se llega a la plataforma de acumulación de la PST (LANDRY y col., 1982), mientras que el decaimiento de la termotolerancia coincide también con la degradación de estas PSTs (LI y LASZLO, 1985).

B) Estrés biológico por interacciones huésped-parásito.

Según datos suministrados por COLLINS y HIGHTOWER (1982), el virus de la enfermedad de Newcastle desencadena una situación de estrés en células de embrión de pollo y estimula la acumulación de PSTs y de mRNA. También PELUSO y col. (1977), encuentran que en casos de infección de células aviares por virus Sendai se estimula la síntesis de varios polipéptidos celulares. Dichas proteínas fueron caracterizadas un año más tarde por los mismos autores (PELUSO y col., 1978), quienes comprobaron que eran análogas a las sintetizadas por células transformadas por el virus del sarcoma de Roux y también, en otros casos, a las proteínas que se sintetizan en situaciones en las que existe carencia de glucosa en el medio de cultivo. Estas proteínas se caracterizaron como moléculas de 86 KDa, la primera, que no se encuentra en experimentos posteriores, y otras dos más -de 99 KDa y 78 KDa, respectivamente- que se observaron en situaciones de privación de glucosa; y también, aunque en menor concentración, en células no infectadas por virus y cultivadas en condiciones normales (Mc CORMICK y col., 1979); e incluso en células expuestas a inhibidores de la glicosilación (POUYSSSEGUR y col., 1977) y a tunicamicina (OLDEN y col., 1979).

Cuando células no infectadas se someten a una situación de estrés, la rápida acumulación de PSTs va acompañada por incrementos en la velocidad de síntesis más que por cambios en la velocidad de degradación (HIGHTOWER, 1980), habiéndose demostrado además, que en el citoplasma existen niveles incrementados de un nuevo mRNA funcional coincidente con estas situaciones de estrés (HIGHTOWER y WHITE, 1981; KELLEY y col., 1980). En cualquier caso, la adición de actinomicina D a las 3,25 horas después de una infección viral, es capaz de bloquear el incremento de estas proteínas sintetizadas "de novo" y de su mRNA funcional (COLLINS y HIGHTOWER, 1982). Una simple interpretación del fenómeno es que la respuesta a este estrés experimental es

debida a un incremento en la transcripción del gen iniciada después de casi 3 horas y 15 minutos.

LA THANGUE y col. (1984) observaron que virus con grandes moléculas de ADN del tipo herpes simplex (VHS), eran capaces de aumentar la acumulación de proteínas de estrés, cuyo papel se supone es el de una respuesta protectora. En células neuronales, las infecciones con proliferación viral, no son la única causa del estado de estrés, puesto que VHS-1 y VHS-2 pueden permanecer en estado de latencia, mientras que al VHS-2 se le ha implicado también en fenómenos de transformación y oncogénesis (GALLOWAY y Mc DOUGALL, 1983). Esta variabilidad en la respuesta a infecciones por VHS sugiere que existen factores en la célula huésped que pueden determinar la resultante de la interacción virus-célula.

Se han descrito implicaciones relativas a reacciones de estrés en infecciones bacterianas (KAUFMANN y col., 1987), hasta el punto de que YOUNG y col. (1988) estudiando la respuesta inmunitaria a bacilos de tuberculosis y lepra, encontraron que algunos antígenos exhibían una extraña similitud de secuencia con algunas PSTs ya conocidas, lo que les llevó a afirmar que en estos casos existían dos proteínas de estrés que eran dianas inmunitarias frente a lepra y tuberculosis (YOUNG y col., 1988). Estas proteínas, nominadas en función de su peso molecular, son la 71-KDa y la 65-KDa, que son homólogas a las proteínas 60-KDa y GroEL encontradas en *Escherichia coli* (BARDWELL y CRAIG, 1984; LINDQUIST, 1986), *Salmonella typhimurium* y *Coxiella* (WODKIN y WILLIAMS, 1988), como una de las proteínas de estrés que, además, pueden utilizarse como antígenos principales.

El papel de estas proteínas parece relacionarse con los sistemas de protección de las bacterias frente al medioambiente hostil producido por los macrófagos del huésped en presencia de los patógenos bacterianos (CHRISTMAN y col., 1985; MORGAN y col., 1986). Efectivamente, se ha comprobado que el muramil-dipéptido (MDP), que es una molécula

derivada de las estructuras periféricas del *M. tuberculosis*, tiene algunos efectos adversos de naturaleza pirogénica (DINARELLO y ROSENWASSER, 1981), aunque existan algunos análogos sintéticos del MDP que carecen de estas propiedades, como sucede con el 3'-n-propil-MDP (DAMAIS y col.,1982). Pues bien, la primera de estas moléculas es capaz de producir cuadros de distress en cobayas, que son originados por el factor FEC ("factor estresante de cobayos") producido en los macrófagos sometidos a una estimulación por MDP (BYARS, 1984). Sin embargo, la molécula 3'-n-propil-MDP conserva sus propiedades inmunocoadyuvantes pero carece de toxicidad. En cuanto a protozoos parásitos, también se encuentran proteínas de estrés por shock térmico del tipo 70-KDa en *Plasmodium* (BLANCO y col.,1986), *Schistosoma mansoni* (HEDSTROM y col.,1987) y en la filaria *Brugia malayi* (SELKIRK y col.,1988).

C) Estrés psiconeurógeno y mecanismos de adaptación.

Desde los tiempos de Darwin en 1871, se piensa que la supervivencia de las especies entraña una ventaja evolutiva que se logra a expensas de una capacidad de adaptación al medioambiente. Casi cincuenta años más tarde, en el concepto de "emergencia" sugerido por CANNON (1915), se admite que una adaptación al desafío del medioambiente puede ser el resultado de una relación entre cerebro, comportamiento y sistema endocrino, particularmente del sistema adrenomedular. Hoy está perfectamente admitido que para adaptarse a las demandas, tanto sociales como del medioambiente, los seres humanos y los animales requieren una concatenación de respuestas que afectan tanto al sistema autónomo como a interacciones neuroendocrinas y al metabolismo, para que mediante ellas se pueda mantener una homeostasis mental y corporal.

Así, cualquier estímulo que pueda causar una desviación de valores o situaciones pre-establecidas en la vida de un ser puede originar un cuadro de estrés, que el organismo deberá intentar corregir en sentido opuesto para preservar la constancia del medio interno,

lo que se consigue mediante una adaptación a expensas del SNC. En cualquier proceso de adaptación psicológica existe una permanente y amplia interacción entre el organismo y su medio. En los humanos, este tipo de adaptación conlleva unos intentos de ajustarse a las variables sociales. Los cambios más angustiosos demandados por el medioambiente a los humanos no son de naturaleza física, sino que son cambios con un profundo impacto emocional. SELVE (1950) en su teoría del estrés, señala al córtex adrenal como el principal organizador de las respuestas adaptativas a las diversas demandas del medio. En estas respuestas de **estrés psiconeurógeno** -que implica una interacción de mensajeros químicos- participa la activación del eje hipófiso-adrenocortical, desencadenando lo que se ha dado en llamar "síndrome general de adaptación". En dicho síndrome se puede apreciar una triada sintomatológica compuesta por hipertrofia adrenal, involución del timo y úlcera gastrointestinal.

En todos aquellos casos en que la adaptación hace necesario un ajuste emocional y de comportamiento, resulta esencial la participación de estructuras del sistema límbico, incluyendo en estas funciones adaptativas: a) una integración de la información sensorial; b) un aprendizaje; c) una planificación del comportamiento; d) unas respuestas motoras; y e) un ajuste neuroendocrino. Todo ello nos ha de servir para mantener nuestro equilibrio en la continua lucha por la existencia.

En el sistema límbico cabe distinguir dos partes, como se explicó anteriormente, según que la respuesta afecte a la parte media del cerebro ("limbic midbrain system") o a la parte anterior ("limbic forebrain system"). En el primer caso, a través del sistema activador reticular ascendente (SRAA), se desencadena una reacción del sistema de vigilancia o alerta general cuando se percibe un estímulo que puede ser significativo para la supervivencia. Dicho estímulo puede ser nocivo, amenazador o de recompensa, pero la atención o curiosidad y viveza para la acción de responder se incrementa cada vez que este se produce. En cada caso, los sistemas fisiológicos de acción subordinada que

conlleven estas respuestas están activados, principalmente, a través del sistema nervioso autónomo.

Si esquematizamos según SMELIK (1987) los distintos acontecimientos involucrados en una respuesta de adaptación a un estímulo que surge del medio (Fig. 3), habremos de distinguir, en primer lugar, el efecto sobre el SRAA por lo que en terminología sajona se ha dado en llamar "reaction arousal" y que no es otra cosa que la respuesta primaria del estrés; ésta equivale a la reacción de alarma citada por SELVE (1950) y es una respuesta

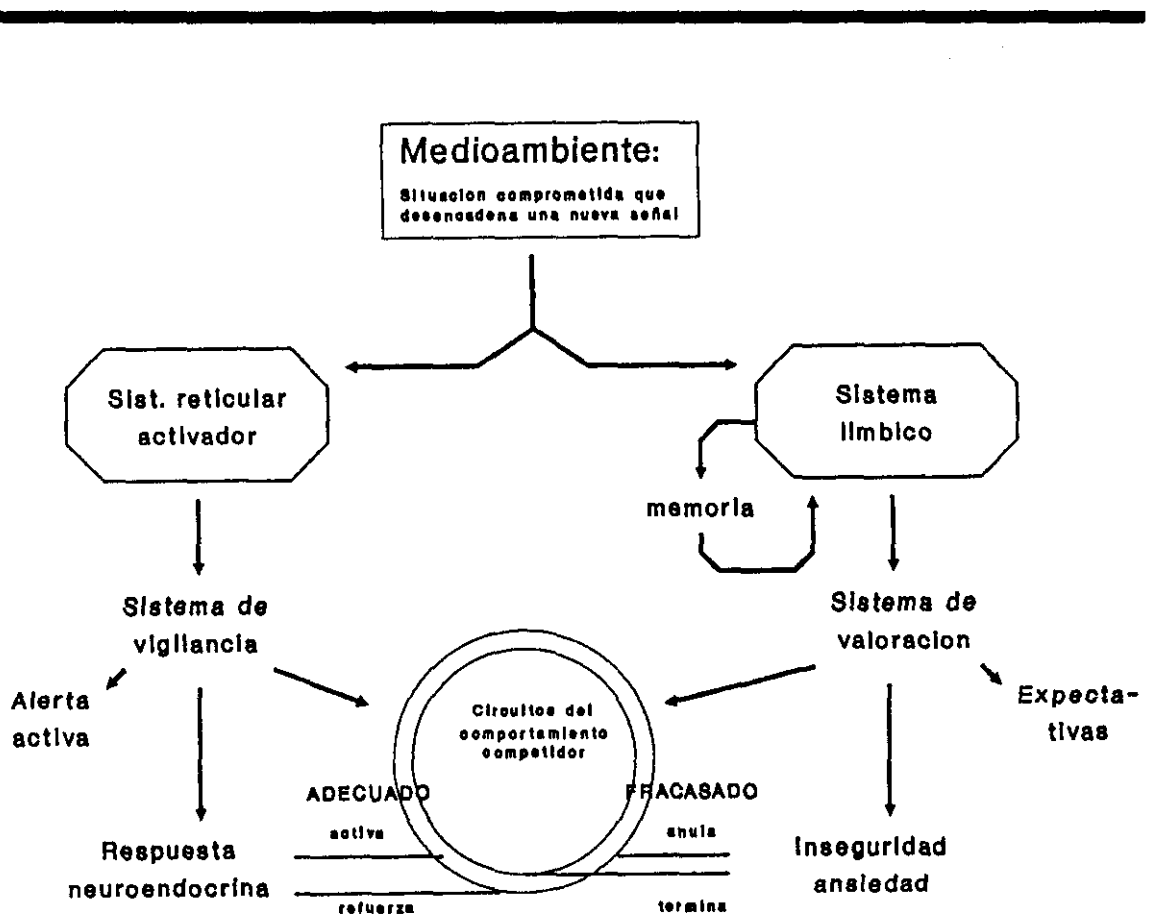


Fig. 3.-Representación esquemática de los diversos acontecimientos involucrados en respuestas de adaptación a estímulos medioambientales.

no condicionada, próxima a los reflejos orientativos de PAVLOV. Según esto, dichas reacciones de alarma forman parte del comportamiento diario y no constituyen una

reacción de emergencia sino una respuesta de reflejo adaptativo primario a señales biológicamente significativas.

Cuando se percibe una de estas señales se hace preciso iniciar una respuesta; para ello, el animal evaluará la situación antes de decidir el comportamiento a seguir. Dicha evaluación tiene lugar en el sistema límbico anterior del cerebro, donde se compara la nueva situación con experiencias previas y se cuantifica la significación del estímulo examinando en paralelo la información previa almacenada y los nuevos datos (SOKOLOV, 1963). Entonces, el hipocampo recibe la información almacenada en el lóbulo temporal ("recuperación de memoria") y suministra un mapa espacial que, orientado sobre el medioambiente actual, permite tomar decisiones o hacer predicciones acerca de la expectativa de acontecimientos. Cuando la sensación es de seguridad o tiene un sentido de provecho, la reacción de vigilancia o alarma se extingue y la respuesta de estrés desaparece; por el contrario, si la expectativa es incierta o inquietante, o incluso negativa porque un daño cierto existe, entonces la reacción de alarma se mantiene y avisará de que deben tomarse acciones defensivas frente al nuevo acontecimiento.

En esta planificación de la respuesta del comportamiento, el lóbulo frontal, que también puede ser considerado como del sistema límbico puesto que existen importantes conexiones directas entre el córtex pre-frontal y las estructuras límbicas del cerebro medio, es capaz de integrar y controlar todo el proceso informativo, estableciendo una asociación entre el flujo de información sensorial y la carga emocional desde las áreas del sistema límbico. Una vez juzgada la situación real, se toma una decisión sobre el comportamiento a seguir para eliminar el peligro o daño inminente. En esta disyuntiva de realizar o evitar un enfrentamiento, la amígdala juega un papel primordial.

En las situaciones de enfrentarse a un nuevo acontecimiento inesperado, también puede suceder que no se encuentre una respuesta adecuada o que se bloquee la capacidad de respuesta ("sensación de desamparo"). En tal caso, según GRAY (1982), se

produce una inhibición del comportamiento o congelamiento (*"freezing"* para los sajones) en la que como decisión preferente se adopta la de no hacer nada. Esta estrategia obedece a una actividad del sistema septo-hipocámpico y se caracteriza por el mantenimiento de un alto nivel en la actividad del sistema de alarma o vigilancia, con una marcada sensación de alerta y anticipación de la ansiedad. Con ello, todos los mecanismos de defensa permanecen en situación de alarma, el estado emocional es tenso y ansioso, prevaleciendo la sensación de desamparo. En la actualidad esta situación es considerada como la de **máximo estrés** en un individuo. Según LEVINE y cols. (1978), es posible salir de esta grave situación mediante un comportamiento de adecuada serenidad que facilite la desaparición de la ansiedad; con ello se extinguirá la reacción de alarma y se atenuará el estado de activación neuroendocrina. Este comportamiento significaría que se ha producido una adaptación adecuada mediante un comportamiento competitivo. Eventualmente, esta capacidad de competición reduce las consecuencias patológicas de las situaciones de estrés; por el contrario, actitudes de conflicto, desamparo y frustración agravan profundamente los síntomas del estrés.

Ante esta problemática, resumida en la Fig. 3, parece claro que el sistema límbico es esencial para controlar la adaptación al medioambiente, no sólo en cuanto a la participación de las estructuras cerebrales afectadas por los mecanismos específicos de la adaptación sino también en el sentido de que las respuestas emocional y de comportamiento son fundamentales para conseguir el éxito en la adaptación al medioambiente.

En cuanto al ajuste neuroendocrino que permite completar esta adaptación al medioambiente, iniciada mediante la plasticidad del sistema neural, se realiza a través de una red de señales que ponen en marcha una serie de cambios químicos y morfológicos en determinadas poblaciones de neuronas y células gliales (Fig. 2) en las que se plasma la respuesta adaptativa del cerebro. El sistema endocrino está estrechamente regulado por

el cerebro, a través del hipotálamo y la hipófisis; debido a esto, la interacción recíproca entre hormonas y cerebro proporciona una ruta por la que pensamiento y emociones pueden influir en la secreción hormonal. Es decir, que los sistemas nervioso y endocrino, a través de sus complejas interrelaciones, consiguen que el comportamiento, conocimiento y afecto puedan influir en la estructura y función del cerebro.

Los ejemplos más significativos de la interacción neuro endocrina son concernientes con aquellos acontecimientos de la vida animal asociados con el ciclo actividad-sueño y con la acomodación del comportamiento a experiencias vitales de tensión. El eje cerebro-hipofisis-suprarrenales juega un importante papel coordinador de la actividad diaria en acontecimientos relacionados con el ritmo vigilia-sueño, y en aquellos que median en la capacidad del animal para soportar las situaciones de estrés.

Mc EVEN y BRINTON (1987), al revisar los fenómenos de activación, adaptación y atrofia dependientes de la acción de esteroides adrenales en el cerebro, resaltan la existencia de procesos fundamentales en el eje hipófiso-adrenal, como son las variaciones diurnas en cuanto a secreciones y un efecto estímulo-dependiente que se produce durante actividades inducidas por situaciones de estrés. Cada patrón de comportamiento permanece asociado con diferentes efectos de la secreción adrenal sobre el cerebro y da lugar a resultantes de activación o de adaptación. Durante el ritmo diurno de secreción adrenocortical, los glucocorticoides ejercen efectos activadores que se sincronizan en el cerebro para mejorar algunos aspectos específicos de la función cerebral. De este modo, el ritmo glucocorticoide sincroniza los patrones de secreción del CRF y ACTH que, a su vez, controlan la producción de esteroides adrenales (CHEIFETZ y col.1968; HIROSHIGE y SAKAKURA, 1971).

Tanto en especies nocturno-activas como la rata, como en las diurno-activas (de las que es un típico ejemplo la especie humana), los glucocorticoides aumentan antes de despertarse el individuo. Este incremento estimula actividades exploratorias (Mc INTYRE,

1979; VELDHUIS y col.1982) y comportamientos en busca de alimento (JHANWAR-UNIYAL y col.1986), los cuales aparecen asociados al comienzo del periodo activo. La anticipación de alimentos actúa como un estímulo poderoso en la rata, puesto que al modificar el momento de alimentación se puede desplazar el máximo de secreción de corticosterona (HONMA y col.1984; KRIEGER, 1974). Por el contrario, si se practica una adrenalectomía, con la consiguiente variación diurna en el nivel de glucocorticoides, se producen incrementos de eficacia sináptica en el hipotálamo durante las horas de vigilia (BARNES y col.1977; DANA y MARTINEZ, 1984), desplazándose este máximo de actividad en unas 12 horas y apareciendo el óptimo de la función sináptica durante el periodo del sueño (DANA y MARTINEZ, 1984), incluso aunque, en estas ratas adrenalectomizadas (ADX), las variaciones diurnas de sueño y actividad sean mantenidas en una interrelación de fase normal (MICCO y col.1980). Si en estas condiciones de experimentación se implanta un pellet subcutáneo de cortisona que mantenga el nivel hormonal en las ratas ADX, se origina el fenómeno de "sueño paradójico", en el que no se interrumpe el patrón diurno de sueño y actividad, sino que se aumenta la actividad al final del periodo de vigilia aunque también aumente el sueño al comienzo del periodo de descanso (MICCO y col.1980).

Cuando en pleno ritmo diurno se superpone una situación de estrés que induce una actividad hipófiso-adrenal, se pone en movimiento un periodo adicional de adaptación: en primer lugar, las secreciones adrenocorticales retroactúan sobre el cerebro y la hipófisis para terminar esta actividad hipófiso-adrenal inducida por el estrés (KELLER-WOOD y DALLMAN, 1984); y después, a consecuencia de éste, se producen efectos retardados y prolongados que se hacen patentes algunas horas más tarde, como pueden ser una depresión de la actividad locomotora y una disminución en la ingesta alimentaria. Si esta situación de estrés se prolonga o repite, la actitud depresiva puede retornar a una situación normal si se produce una adaptación (KENNETT y col.1985). En estos procesos de adaptación a situaciones de estrés, la respuesta neural puede funcionar correctamente, ya

sea oponiéndose a los esteroides adrenales o bien mediante una modificación de respuesta. En el primer caso, vemos que la respuesta del SNC a serotonina aumenta en los casos de estrés repetido (KENNETT y col.1985) y este efecto es contrarrestado, al menos parcialmente, por el aumento de glucocorticoides que se produce durante el estrés (DICKINSON y col.1985). En el segundo caso, la adaptación se produce a expensas de una disminución de la sensibilidad noradrenérgica (STONE, 1983), lo que puede modificar también la acumulación de AMP cíclico (ROBERTS y col.1984).

Cuando una situación de estrés es muy prolongada, llega a producirse una atrofia neuronal, como en los casos de envejecimiento. Esta situación representa un nuevo aspecto de la acción de los glucocorticoides, que es completamente distinta a las de activación y adaptación. Dicha atrofia representa un incremento de la pérdida neuronal producido por excitotóxicas (SAPOLSKY, 1985; 1986) y por un cuadro de hipoxia, que es capaz de elevar el nivel de aminoácidos excitadores (SAPOLSKY y PULSINELLI, 1985). Estos efectos nocivos pueden ser contrarrestados por infusiones de sustancias productoras de energía que sean fácilmente metabolizables (SAPOLSKY, 1986a).

De acuerdo con lo revisado por Mc EWEN y BRINTON (1987) en relación con el estrés, es evidente que el efecto de los glucocorticoides tiene relación con una respuesta de adaptación prolongada en la que interviene el hipocampo y otras regiones del cerebro. Según el tipo de adaptación a las circunstancias que producen el estrés, pueden existir diferencias individuales que conduzcan a situaciones que pueden llegar a ser beneficiosas o bien psicopatológicas; aunque todavía no se conoce exáctamente cómo resulta involucrado el mecanismo de hipersecrección adrenal con ciertas patologías como la depresión endógena, el síndrome de Cushing, o la enfermedad de Alzheimer en la que existe destrucción de neuronas.

Desde el punto de vista neuroendocrino, en esta resultante adaptación-estrés, según que el organismo sea o no capaz de corregir la desviación de los valores pre-

establecidos en un medioambiente determinado, intervienen fundamentalmente los sistemas monoaminérgicos puesto que existen neuronas que transmiten su información a través de la liberación de noradrenalina, serotonina o dopamina (Tabla I). También existen neuronas cuyos mensajes son cursados mediante liberación de neuropéptidos y péptidos opioides, pero sus mecanismos y manipulación farmacológica resultan menos conocidos.

La participación del sistema noradrenérgico aparece involucrada en una reacción de alarma que, en palabras de GRAY (1982), se traducen por *"mantén atención, esto puede ser importante y necesita un cuidadoso control"*. De este aviso se encargan grupos celulares situados en el locus ceruleus, en el tegumento dorsal, proyectándose hacia las partes principales del sistema límbico y el córtex. Se ha sugerido que situaciones en las que se tiene asumida la condición de impotencia o desamparo conducen a un déficit de activación motora como resultado de una depleción de los depósitos de noradrenalina (GLAZER y WEISS, 1975). Otras rutas noradrenérgicas importantes son: a) la que conduce hacia el hipotálamo, mediadora de agresividad y de los comportamientos relativos a sensaciones de hambre/sed; y b) la que afecta a la regulación autonómica.

El sistema serotoninérgico, está involucrado principalmente en el control de las reacciones emocionales frente a experiencias desagradables (dolor y estímulos adversos), e interviene en los ritmos circadianos y sueño. La respuesta se origina en el núcleo del rafe y se proyecta en forma difusa hacia estructuras más elevadas con el fin de informar al sistema límbico y mediatizar específicamente al sistema de inhibición del comportamiento que se relaciona con el septo-hipocampo. Así es posible contrarrestar experiencias emocionales negativas, provocando una relajación o incluso satisfacción e inercia. Según SMELIK (1987), da la impresión de que, en cierto sentido, este sistema es la contrapartida central del parasimpático en la periferia. Ello hace que este tipo de respuesta se asocie siempre con el talante o genio del individuo y que los estados depresivos tengan algo que ver con el funcionamiento inadecuado de dicho sistema serotoninérgico.

Tabla I .-Participación de los sistemas monoaminérgicos en las respuestas neuroendocrinas de adaptación al medio ambiente.

AMINAS BIOGENAS	SISTEMA ACTIVADO	SISTEMA INHIBIDO
Noradrenalina	<ul style="list-style-type: none"> -Vigilancia general no específica -Alerta escudriñadora -Anticipación de tensión -Prontitud de acción -Agresividad 	<ul style="list-style-type: none"> -Sedación -Apercibimiento lento -Apatía -Inhibición Psicomotora -Sumisión
Serotonina	<ul style="list-style-type: none"> -Satisfacción -Relajación -Ritmos diurnos normales -Inhibición motora ante estímulos adversos 	<ul style="list-style-type: none"> Talante negativo -Ritmos diurnos perturbados -Insomnio -Desasosiego
Dopamina	<ul style="list-style-type: none"> -Comportamiento motor coactivo -Motivación del comportamiento emprendedor -Facilita el sistema gratificante -Atención selectiva 	<ul style="list-style-type: none"> -Perturba la coordinación motora -Indiferencia emocional -Inhibe el sistema gratificante -Incapacidad de enfocar la atención

*Modificado de Smelick

La intervención del sistema dopaminérgico en los fenómenos de adaptación, resulta algo más compleja, puesto que se puede considerar dividido en varios subsistemas. Entre ellos, las neuronas mesolímbicas y mesocorticales son las que más participan en los procesos de adaptación; las primeras, en los procesos de estímulo compensatorio o gratificante y también en todos aquellos comportamientos motivados hacia algo positivo (IVERSEN, 1977; WILLNER, 1983); en tanto que, las segundas son cruciales para enjuiciar y planificar dicho comportamiento (GLOWINSKI, 1977). Este sistema facilita la iniciación de actividades dirigidas al éxito, mientras que su inhibición conduce a la indiferencia emocional y falta de iniciativa. También se ha visto que la proyección dopaminérgica hacia el córtex pre-frontal conlleva una atención de enfoque preferente (SMELIK, 1987), de tal modo que si se producen novedades importantes, éstas se conducirán como de tipo estimulante hacia esa zona sin producirse diversificación alguna hacia otras áreas estimulables. Esta persistente hiperactividad sobre el sistema, puede conducir a una preocupación compulsiva hacia ciertos objetos e ideas y ello puede originar los cuadros de psicosis.

En todos estos comportamientos de adaptación psíquica al medio ambiente puede haber también una intervención del sistema opioide modulando las respuestas, aunque como se ha indicado anteriormente su funcionamiento es menos conocido, y de aquí que sea más difícil la manipulación farmacológica de sus funciones adaptativas. SMELIK (1987), apunta que existen indicios de que el papel jugado por este sistema opioide se lleva a cabo modulando la liberación de transmisores monoaminérgicos. Parece que su acción fisiológica, que es de gran amplitud, tiene que ver con la restauración del equilibrio entre sentimientos de felicidad y desgracia, guiando el comportamiento animal hacia los estímulos gratificantes y evitando los adversos. Sin este sistema de castigo/recompensa, el animal no evitaría daños o lesiones y no perseguiría comer o aparearse. Quizá resida aquí el hecho de que la manipulación en un sistema tan importante para el organismo sea

susceptible de alcanzar la farmacodependencia. Varios de estos sistemas intervienen a nivel del hipotálamo, que puede ser considerado como una parte del sistema límbico, aunque relacionado con la periferia, puesto que recibe y coordina toda aquella información que permite regular funciones corporales tales como funciones motoras, actividades metabólicas y vegetativas, homeostasis orgánica, secreciones hormonales y tono visceral.

De los distintos opioides que intervienen en los numerosos parámetros fisiológicos del organismo animal, son las dinorfinas las que parecen más particularmente implicadas en situaciones traumáticas, sobre todo en respuestas a cuadros de shock o estrés (HOLADAY y LOH, 1979). En casos de estrés por agresión en las extremidades se producen aumentos de dinorfina en el hipotálamo y disminuciones en la hipófisis anterior y también en algunas partes de la médula espinal (MILLAN y col.1981); también se ha comprobado en ratas, una liberación de dinorfina mediante estimulación bilateral de los nervios ciáticos o por lesión de las almohadillas plantares (YAKSH y col.1983). Existe evidencia de que la dinorfina interviene de alguna manera en la respuesta inflamatoria, puesto que es capaz de producir una liberación dosis-dependiente de histamina a partir de mastocitos (SYDBOM y TERENIUS, 1985) e inducir una extravasación del plasma (CHAHL y CHAHL, 1986) aunque estos dos efectos no son bloqueados por naloxona: ello hace pensar que se producen a través de receptores no opioides.

Pese a todo lo anteriormente dicho, existe evidencia de que el patrón de respuestas neuroendocrinas frente a situaciones de estrés no siempre es el mismo, sino que depende del status social y emocional de cada individuo, lo que propicia un diferente grado de afectación del subsistema correspondiente en función del grado de ansiedad y vulnerabilidad de cada uno. En el esquema de la Fig. 4, de acuerdo con los datos facilitados por distintos autores incluidos en la revisión de BOHUS y col. (1987), hemos intentado establecer una comparación sistemática de las variaciones entre comportamiento y respuesta neuroendocrina en situaciones de estrés dependiendo de la personalidad del

individuo. Como puede verse, según que el animal tenga un carácter activo o pasivo las respuestas serán completamente distintas así como la resultante frente a un estado de ansiedad, apareciendo dominados por el sistema simpático los animales activos mientras que en los pasivos es el parasimpático el que prevalece.

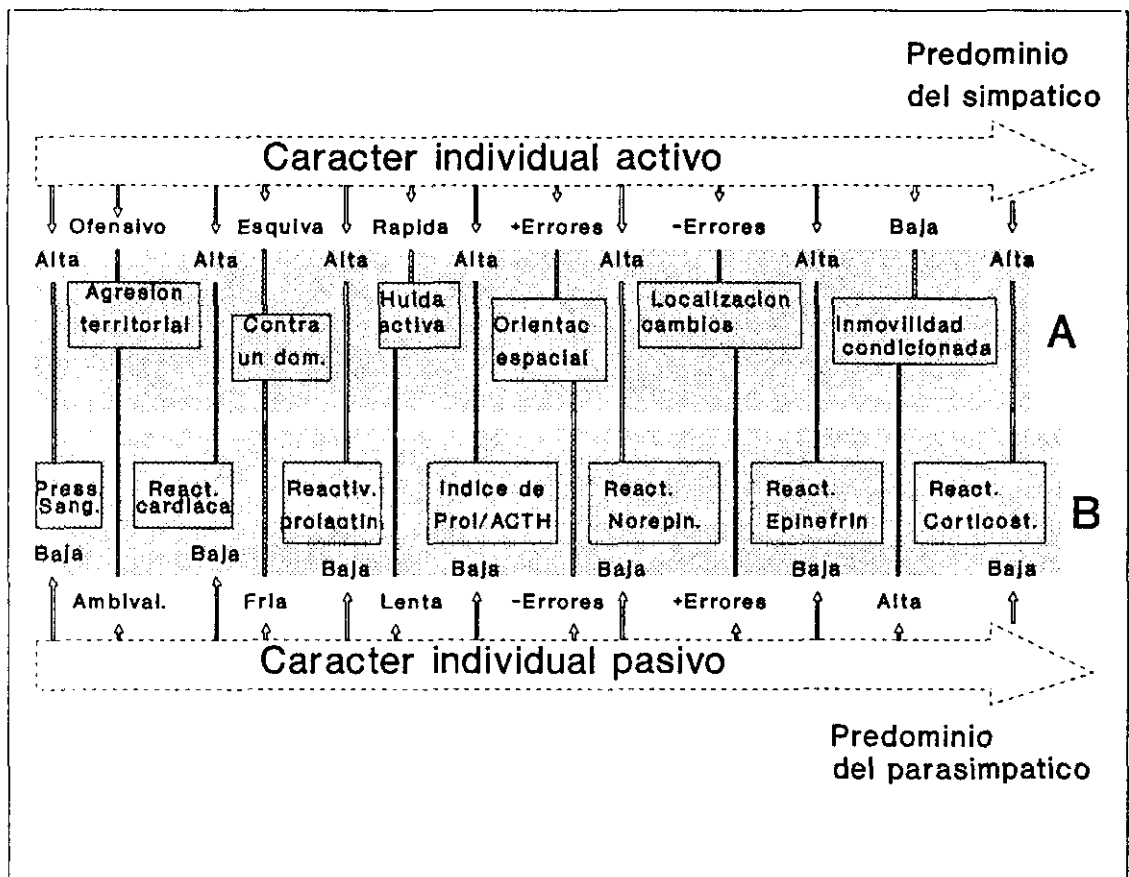


Fig. 4.-Influencia de la personalidad individual en las variaciones entre el comportamiento y respuesta frente a situaciones de estrés.

Está demostrado que las agresiones sociales y psicológicas resultan ser los estímulos más adversos para originar situaciones de estrés y activar los sistemas hormonales (MASSON, 1968), estimulando la liberación de neuropéptidos y otros mensajeros hormonales capaces de modular el comportamiento (De WIED, 1969); a ello se debe posiblemente la plasticidad del proceso adaptativo.

El concepto de estrés psiconeurógeno nos lleva a resaltar la importancia de distintos factores que interactúan entre sí; éstos son la personalidad, situación medioambiental, tipo de estímulo, etc.; su resultante es la que va a inducir perturbaciones funcionales en el individuo, llegando a producir patologías clínicas perfectamente definidas. Son varios los grupos de investigadores que han observado alteraciones del comportamiento que conducen a una patología cardiovascular, o a la aparición de úlceras gastrointestinales, inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes, crecimiento de tumores, etc. (BASSETT y CAIRNCROSS, 1976; WEISS, 1968; ANISMAN y col.1979; SKALAR y ANISMAN, 1979).

Según el modelo propuesto por BOHUS y col. (1987) para la aparición de una enfermedad psicosomática, se distinguen cinco elementos o fases desde el punto de vista neuroendocrino: a) el cerebro, en permanente vigilancia, activa o inhibe sistemas fisiológicos y neuroendocrinos que provocan respuestas de comportamiento inespecíficas; b) se produce la liberación de las hormonas del estrés que activan sus receptores, tanto en la periferia como en el cerebro; c) gracias a estos cambios, el cerebro pasa de su estado inicial a una situación de "cerebro integrado" frente al nuevo estímulo (adoptando una actitud que depende tanto de factores genéticos como de las experiencias adquiridas); d) concluye el proceso informativo, que condiciona la aparición de una respuesta neuroendocrina integrada en un comportamiento más específico; y e) como resultante final, puede implantarse un estado de bienestar o un desequilibrio que desencadene una enfermedad psicosomática.

De aquí que BOHUS y col. (1987), en su revisión del concepto de estrés desde un punto de vista de fisiología del comportamiento, dentro de las interacciones neuroendocrinas, atribuya un importante papel a los neuropéptidos y consideren al cuadro de estrés como una respuesta biológica general frente a las demandas corporales y mediambientales, lo que conlleva usualmente una respuesta funcional.

En cualquier caso, estas situaciones de ansiedad, ya sea en un animal sano o enfermo, dependen de la interacción de muy diversos factores situados a dos niveles. En uno de ellos se distingue: i) el control o predicción de la situación medioambiental del afectado; ii) las características individuales en su estrategia de competición; iii) las propiedades del agente estresante en cuanto a frecuencia y duración; iv) si la respuesta propiamente dicha condicionada por esta nueva situación es de carácter específico o inespecífico; y v) el estado normal o patológico de los sistemas fisiológicos del propio organismo afectado. Pertenecen al otro nivel: i) el sistema nervioso central, cerebro y sistema nervioso autónomo; ii) sistemas de órganos periféricos; y iii) sistema neuroendocrino.

En relación con los mecanismos moleculares de integración neuroendocrina, pese a que en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de la transmisión sináptica (BARCHAS y col.1978; KRIEGER, 1983), todavía existen incógnitas sobre la relación entre el comportamiento en situaciones de estrés, y los cambios moleculares a nivel celular. Efectivamente existen abundantes y variados receptores, localizados en diferentes grupos celulares de la hipófisis, con capacidad para liberar más de un segundo mensajero; asimismo, se localizan conjuntamente grupos de neurohormonas en neuronas secretoras que se relacionan con el sistema portal hipofisario. Esto permite afirmar que la hipófisis controla el sistema como un conjunto y está sometida a una regulación multifactorial en la que es importante conocer: ¿cómo estas células de la hipófisis son capaces de integrar toda esta complejidad de mensajes? y ¿cómo las estructuras hipotalámicas llegan a coordinar la emisión de señales múltiples dirigidas a la hipófisis?

Como resumen de los mecanismos de integración de mensajes complejos, diremos que, en su mayor parte, las señales que llegan a la hipófisis son mediatizadas por receptores acoplados a adenilatociclasa o fosfolipasas, dando lugar a diferentes modos de transducción de señales (Fig. 5), aunque exista un modo universal de acoplamiento

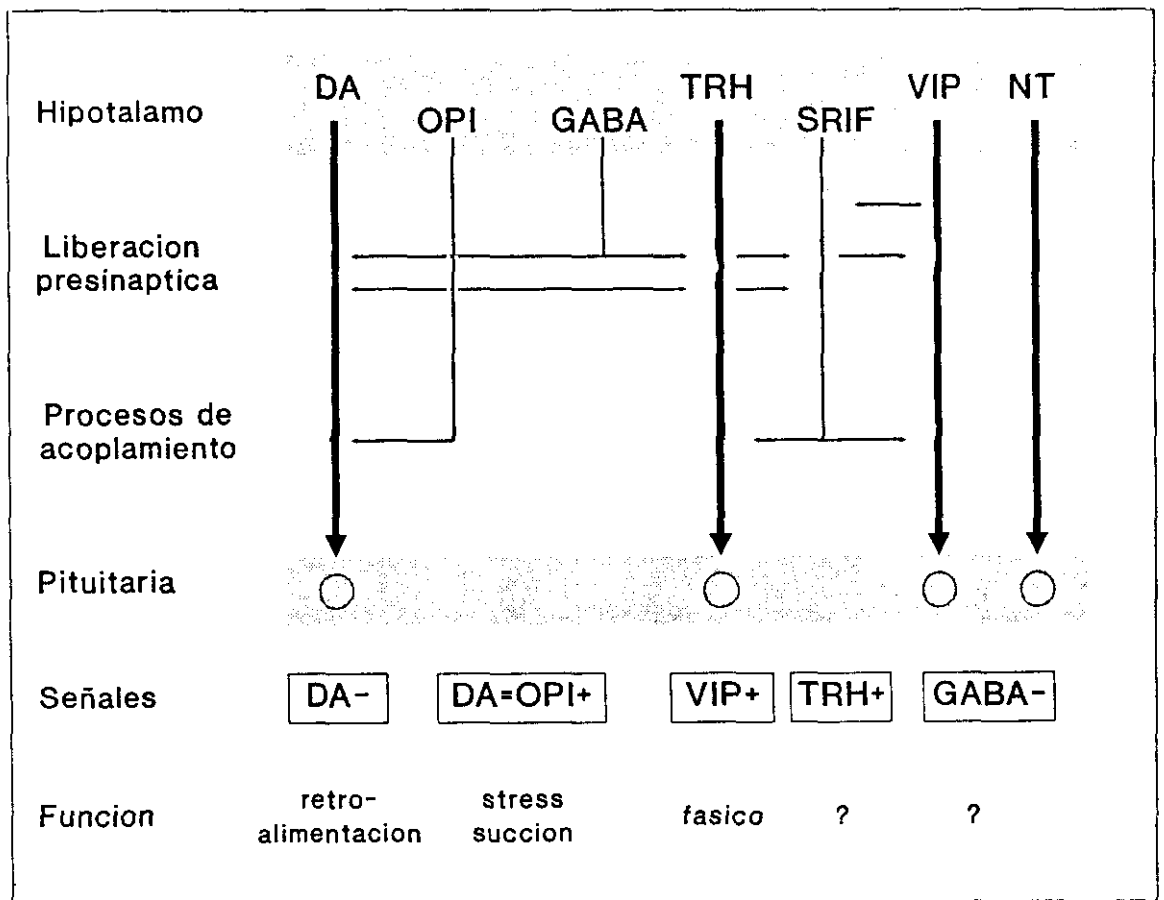


Fig. 5.-Esquema de una posible regulación multifactorial en la que se resume la integración de mensajes complejos que llegan desde el hipotálamo a la hipófisis, y que pueden dar lugar a diversos modos de trasducción de señales.

biológico en todos los tejidos. La mayor diferencia entre células, que permiten una lectura selectiva entre las distintas dianas, no depende de un diferente modelo de recepción de las señales elementales sino del particular reagrupamiento de células selectivas que modifica el acoplamiento de sus propias cadenas metabólicas. Así, las prostaglandinas producidas por activación de la fosfolipasa C pueden, a su vez, activar la adenilatociclase (ROBERTSON, 1986) y de este modo amplificar un mensaje inicial de una hormona fosfolípido-dependiente. En el sentido inverso, los nucleótidos cíclicos AMPc o GMPc también pueden actuar, por un proceso de retroalimentación, sobre la fosfolipasa C y

detener su actividad bloqueando la movilización del calcio y terminar un mensaje iniciado mediante el acoplamiento de ciclasas (WATSON y col. 1984).

La emisión de las señales multifactoriales necesarias para el funcionamiento del sistema se realiza a través interconexiones a través de numerosos axones colaterales. Estos elementos neuronales, funcionando como marcapasos, generan controles pulsátiles de distintas neurohormonas. Los circuitos hipotalámicos desarrollan estímulos neuronales que liberan opioides-dopamina u opioides-somatostatina, según los casos, para el control de las neurohormonas en el mantenimiento de la homeostasis. La Fig. 5 da una idea de la complejidad del sistema, en cuanto a la participación de neuropéptidos y transmisores involucrados en los sistemas de transmisión de señales desde el hipotálamo a la hipófisis, obtenida de acuerdo con datos revisados por KORDON y col. (1987). Estos autores sugieren la existencia de un sistema codificado en el que la selectividad de un mensaje hipotalámico a la hipófisis no depende de una señal simple, sino mas bien de combinaciones de señales que transportan diversos mensajes de acuerdo con la ruta o clave empleada. De esta forma, según puede deducirse por la figura, el papel representado por cada conjunto de señales refleja una situación anímica y cualquier alteración en la clave puede provocar un desequilibrio que conduce a una situación de estrés. Esta alteración de la homeostasis puede producirse, bien a nivel de las señales que transportan el mensaje biológico, o bien modificando las que están involucradas en la dirección o destino del mensaje.

Con lo hasta aquí resumido, y teniendo en cuenta los elementos que intervienen en la relación individuo-medioambiente, cabe distinguir dos componentes en las situaciones de ansiedad: i) un **componente inespecífico** de la respuesta de estrés, que tiene su origen en la activación o inhibición del comportamiento y de los sistemas fisiológico y endocrino; y ii) el **componente específico** de la misma, que se alcanza después de interactuar la situación medioambiental según posibilidades de control y predicción, la estrategia de

competición (individuos pasivos o activos), las propiedades del agente estresante y el sistema orgánico (cardiovascular, metabólico, etc.). Todos estos factores juntos determinan la magnitud, el patrón temporal y el índice de respuesta en cada situación determinada, en la que también tienen gran significación las características personales del individuo en relación con el medio y el momento de intervención del agente estresante, así como la ruta por la que se organizó el patrón de respuesta específica.

De este modo, según la situación estado neuroendocrino del cerebro, se puede llegar a un estado de salud o enfermedad dependiendo del equilibrio de la mente y el cuerpo.

I.3.- EFECTOS DEL ESTRES SOBRE LA INTERACCION NEUROINMUNE.

Estudios neuroanatómicos, neuroquímicos y neuro-endocrinológicos revelan la existencia de relaciones funcionales entre los sistemas nervioso central y autónomo, y el sistema inmune. Desde el **punto de vista anatómico** hace tiempo que se descubriera la organización en la que permanecen asociados órganos nerviosos e inmunes que propician los fenómenos de inervación propia de la médula ósea (KUNTZ y RICHINS, 1945), timo (HAMMAR, 1935), bazo (LIVETT y col., 1968) y nódulos linfáticos (GIRON y col., 1980). De tal modo es ésto, que lesiones neurológicas en dichos organos pueden facilitar el que a su vez se originen alteraciones inmunitarias a partir del hipotálamo (CROSS y col., 1980) u otras áreas cerebrales, ya sea en relación con el diencefalo (HALL y col., 1978) o con el neocórtex (RENOUX y col., 1980; 1982). Asimismo, es posible encontrar fibras del sistema simpático que penetran hasta la misma pulpa blanca del bazo donde se localizan los linfocitos capaces de reconocer y reaccionar frente a un antígeno (REILLY y col., 1976).

Desde el **punto de vista neurobioquímico**, también en las células responsables de la respuesta inmune -los linfocitos-, junto con otros receptores que influyen en la inmunomodulación (HADDEN, 1983), se han encontrado receptores para agentes dopaminérgicos (LE FUR y col., 1980), para acetil-colina (RAIMOND y col., 1984) e incluso para endorfinas, que son moduladoras de respuestas neuroinmunes (BESEDOVSKY y col. 1983). Estos receptores opioides, encontrados en células inmunocompetentes, y de cuya revisión se ocupan SIBINGA y GOLDSTEIN (1988), no están todavía plenamente caracterizados, y su significación en determinadas respuestas inmunitarias se considera en función de que puedan ser o no bloqueados, o revertidos, por la presencia de naloxona.

La integración a **nivel funcional endocrinológico** de los sistemas nervioso e inmune empezó a sospecharse desde que las modificaciones en la actividad eléctrica de neuronas localizadas en la zona basal media del hipotálamo eran capaces de producir cambios a nivel de la neurotransmisión, y estos iban acompañados de variaciones en una respuesta inmunitaria (BESEDOVSKY y col. 1977;1977a;1979). Otros indicios funcionales de las interrelaciones inmuno-neuroendocrinas pueden encontrarse en las distintas modificaciones de la actividad de hormonas peptídicas que pueden ser transferidas a células a través de un mensajero secundario (LAWRENCE y col.,1978; BLALOCK y BARON, 1977;BLALOCK,1984). También, diversas moléculas de interferón que llegan a producir efectos semejantes a la noradrenalina en células de miocardio (BLALOCK y STANTON, 1980), pueden aumentar la incorporación de yodo a células tiroideas, producir fenómenos corticotrópicos en células adrenales (BLALOCK y SMITH, 1981; JOHNSON y col., 1984; OPPENHEIM y GERY, 1982) o incluso presentar una actividad opiácea en linfocitos análoga a la de las endorfinas (BLALOCK y SMITH, 1981). Pese a estos resultados, que implican una similitud de efectos entre hormonas e interferones, los estudios sobre relación estructura-actividad son controvertidos, ya que si para BLALOCK y SMITH (1980) existe

una relación biológico-estructural entre el interferón leucocitario y la hormona adrenocorticotropa, para EPSTEIN y col. (1982) aparece una total ausencia de homología estructural y funcional entre los interferones y las moléculas de ACTH y β -endorfinas humanas, lo que dificulta la interpretación de los hechos desde un concepto unitario de la actividad biológica.

Existen abundantes datos que apoyan una eficaz comunicación neuroinmunitaria, lo que no es extraño puesto que ambos sistemas -nervioso e inmune- poseen importantes características comunes como son la comunicación a distancia mediante el empleo de mensajeros químicos y la capacidad de memorizar situaciones previamente aprendidas. De aquí que BLALOCK (1984) llegue a considerar al sistema inmune como un órgano sensorial en el que existe una comunidad funcional entre linfoquinas y péptidos neuroendocrinos, mientras que INGLOT (1983) establece un concepto hormonal del interferón y DAFNY y col. (1985) suponen que las distintas moléculas de interferones pueden servir como "elementos de comunicación" entre ambos sistemas, nervioso e inmune. Todo ello hace preguntarse a BALLIEUX y HEIJNEN (1987) si entre cerebro y sistema inmune se originan monólogos o se establece un genuino diálogo,

1.3.1- Modificación de respuestas inmunitaria en estados de ansiedad.

Ya hemos visto que pese a la autosuficiencia del sistema inmune para realizar su propio programa de reconocimiento de lo ajeno al huésped y de la defensa de su organismo, está obligado a participar de las actividades de regulación de otros sistemas (nervioso y endocrino), con los que aparece integrado, manteniendo un perfecto equilibrio homeostático en su funcionamiento. Cualquier situación patológica, ya sea por una infección viral (BLALOCK y SMITH, 1985) o, por ejemplo, cuadros clínicos de linfoma (MILLER y col., 1983), pueden producir liberación de endorfinas y adrenocorticotropinas.

De todas aquellas alteraciones de la homeostasis neuroinmune, las relacionadas con mecanismos de excitación emocional son las que más han despertado nuestro interés. En la bibliografía recogida se encuentran datos relativos a situaciones de estrés y alteraciones afectivas, o por exceso de ejercicio físico, en las que se producen modificaciones en el nivel de encefalinas-endorfinas (PLOTNIKOFF y MURGO, 1985; EDWARDS y col.,1984) que dan lugar a inhibiciones tanto de las respuestas linfoproliferativas (BARTROP y col.,1977; SCHLEIFER y col., 1983) como de la actividad citotóxica natural (SHAVIT y col. 1984).

Este efecto inmunomodulador de los estados depresivos a través de la función neuroendocrina fué estudiado por STEIN y col. (1985). Parece producirse a nivel de receptores dopaminérgicos por su implicación en los cuadros de estrés en los que también pueden intervenir las encefalinas (AMIR y col.,1980). También, en experimentos "in vitro" se ha comprobado la relación neuro-inmune a nivel dopaminérgico, puesto que distintos compuestos neurolépticos son capaces de producir inmunosupresión de respuestas blastogénicas mitógeno-inducidas (PORTOLES y col.,1983).

Para comprender mejor los posibles mediadores entre la actividad neuronal y la función inmunitaria, de acuerdo con lo señalado por BRAINARD y col.(1987), CROISSET y col.(1987) y MOULIAS (1987) para distintos estímulos medioambientales, quizá sea oportuno establecer un esquema resumiendo el nivel de interacción de los distintos factores emocionales que podrían clasificarse como: estáticos, crónicos y agudos (Fig. 6). De aquí que la salud mental y el desequilibrio psíquico puedan ser considerados estados influenciados por el medio ambiente y la capacidad de adaptación del organismo, tal como señalábamos en apartados anteriores.

Contempladas desde la vertiente inmunológica, estas situaciones de estrés y enfermedad psiquiátrica, se observa que frecuentemente aparecen cuadros de inmunosupresión a un nivel más o menos específico y de una intensidad variable, que

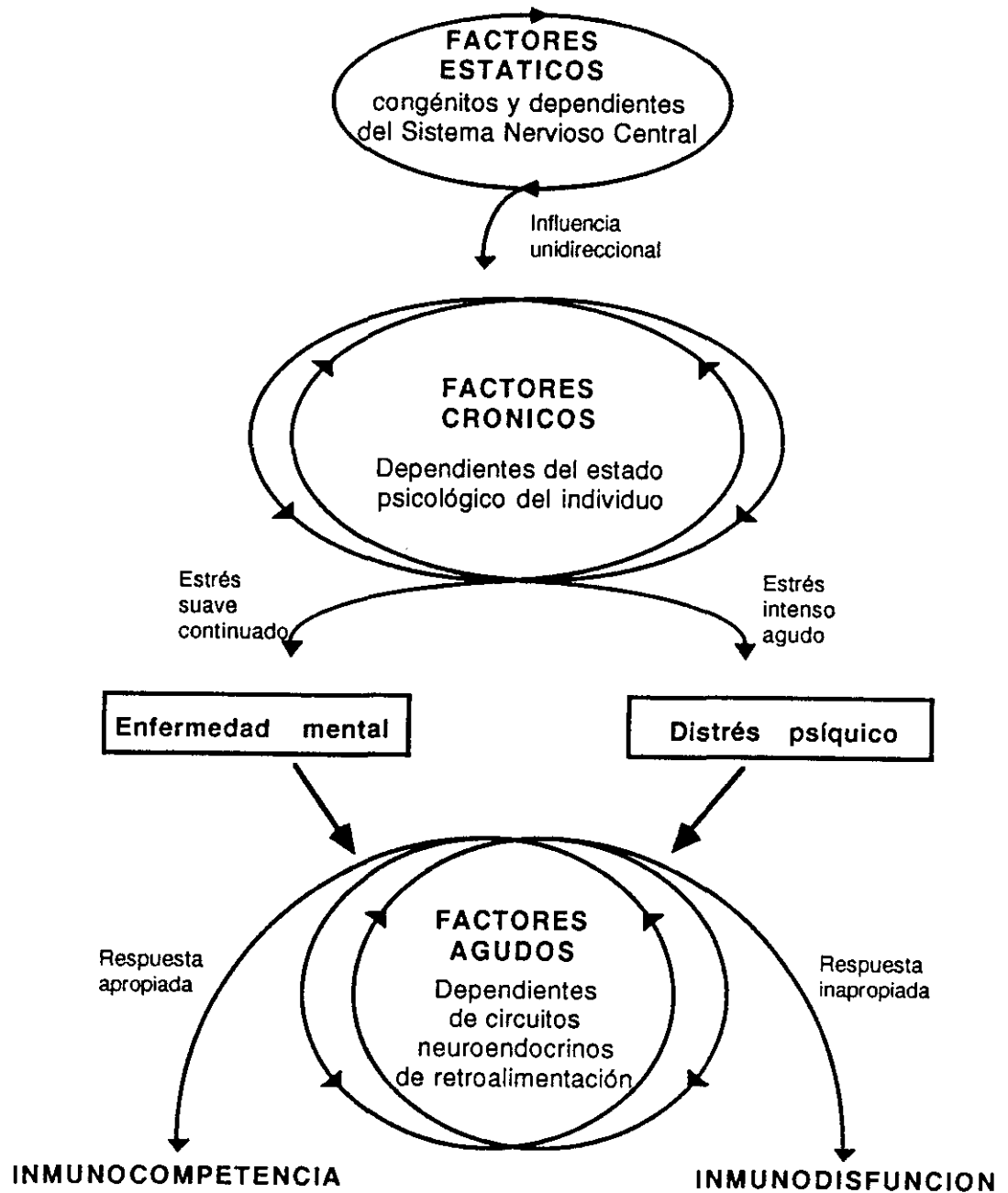


Fig. 6.-Representación esquemática de las interacciones entre distintos factores psicológicos que condicionan la respuesta inmune en situaciones de estrés.

pueden conducir a patologías perfectamente definidas de hipersensibilización, inmunodeficiencia, autoinmunidad o carcinogénesis, entre otras. Pero también -dada la interacción bidireccional existente entre los sistemas nervioso e inmune-hay casos en que una situación de ansiedad va acompañada de una estimulación de la respuesta inmunitaria.

Así, aunque parece generalmente admitido que esta inmunosupresión es debida a una elevación de glucocorticoides, también pueden encontrarse ejemplos en los que a un aumento de esteroides adrenocorticales corresponde una potenciación de la respuesta inmune (PARILLO y FAUCI, 1979; COHEN y CRNIC, 1982; MUNCH y col., 1984). Además, un agente estresante puede aumentar o disminuir diferentes respuestas inmunitarias y tan sólo alguno de estos efectos puede estar mediado por la respuesta adrenal.

Todo esto es lógico si se tiene en cuenta la heterogeneidad de las subpoblaciones de linfocitos T y su variabilidad en cuanto a los receptores de glucocorticoides que se expresan en su superficie (DISTELHORST y BENUTTO, 1981). Por otra parte, también se pueden encontrar efectos diferentes sobre la respuesta inmune, cuando tiene lugar una administración de glucocorticoides exógenos (ROJO y col. 1984), dependiendo de: a) las características de la molécula para un huésped determinado; b) la dosis y el momento de administración del esteroide, que influirán en la magnitud y dirección de los efectos inmunofarmacológicos; y c) el parámetro inmunitario que se controla en cada órgano particular. Así se ha observado que la dexametasona puede producir en la formación de células sintetizadoras de anticuerpos, unos efectos supresores o estimulantes dosis-dependientes, según que se trate del bazo o de la médula osea (BENNER y VAN OUDENAREN, 1979); y también, que aunque es posible disminuir el rechazo a los trasplantes de piel en ratones mediante la administración de cortisol, no se consigue este efecto cuando en su lugar se administra corticosterona (MEDAWAR y SPARROW, 1956). En humanos, no existe una correspondencia exacta entre la actividad anti-inflamatoria de

distintas moléculas esteroideas, naturales y sintéticas, con sus efectos modificadores de la respuesta inmune en distintas subpoblaciones linfocitarias (LANGHOFF y col.,1985).

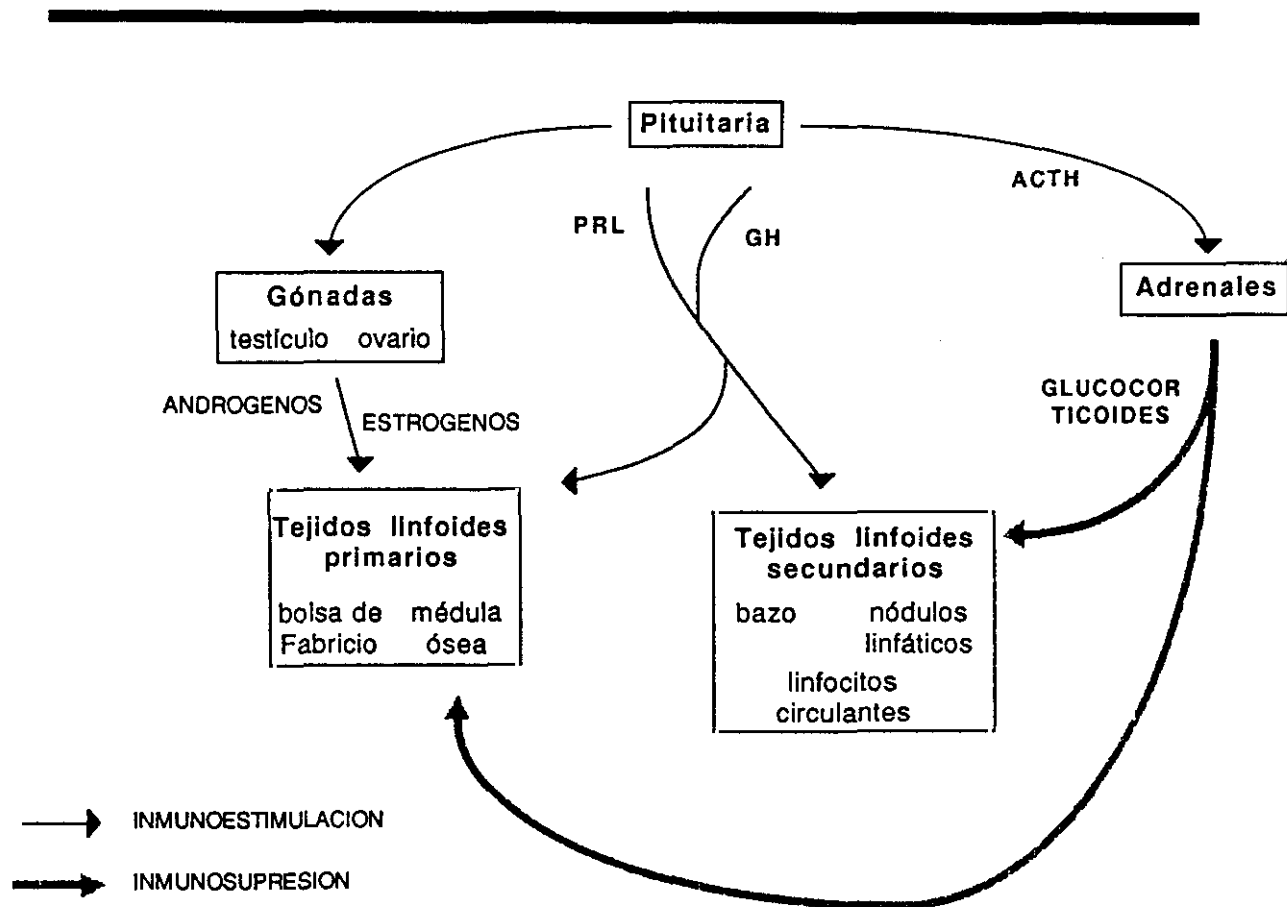


Fig. 7.-Representación esquemática de las interacciones de las principales hormonas con capacidad para modular la respuesta inmune.

Al observar en la Fig. 7 un esquema de las principales hormonas con capacidad para modificar las funciones inmunitarias, se puede ver que la hormona del crecimiento (GH) y la prolactina (PRL) -segregadas por la hipófisis- son capaces de estimular los tejidos linfoides primarios y secundarios produciendo aumentos en la respuesta inmunitaria, mientras que las hormonas sexuales masculinas (andrógenos) y femeninas (estrógenos) -así como también la prolactina y con toda probabilidad las hormonas placentarias (PL)-, participan como inmunomoduladores al contribuir a la regulación de los fenómenos

inmunes durante la reproducción. Por el contrario el eje ACTH-adrenal constituye la rama supresora de este sistema de regulación produciendo efectos inhibidores sobre todos los órganos linfocitarios y sobre los linfocitos circulantes. BERCZI y NACY (1986), al revisar el control hipofisario del tejido hemolinfopoyético y la función inmune, sugieren que los glucocorticoides son esenciales para el mantenimiento del control inhibitor del sistema inmune, evitando activaciones linfocitarias inadvertidas que pudieran conducir a la autodestrucción celular por clones autoinmunes. Este efecto fisiológico de las moléculas glucocorticoides alcanza a la recirculación linfocitaria, a los marcadores de membrana de los linfocitos y a distintas funciones capaces de inhibir linfocitos y monocitos. Por otra parte, existen factores capaces de contrarrestar este efecto inmunosupresor de los glucocorticoides; entre ellos, se encuentran algunos factores tímicos, linfoquinas tales como interleuquinas e interferones, un factor modificador de la respuesta glucocorticoidea, un factor antagonista de glucocorticoides y un factor reemplazante de células T esteroide-dependientes.

También, como vemos en este esquema de regulación inmune que parte de la glándula hipofisaria (Fig.7), puede haber participación de β -endorfinas y adrenalina con un papel moderador o inmunosupresor. Es preciso señalar que las secreciones de ACTH y de β -endorfina están reguladas en la hipófisis por una ruta común, mientras que la síntesis de adrenalina está controlada por mecanismos neurales y glucocorticoides (NAKANISHI y col.,1979; RISCH y col., 1983; AXELROD y REISINE, 1984).

Este cuadro de regulación del sistema inmune puede verse afectado por la aparición de señales neurofisiológicas, por medio de las cuales el SNC puede, a su vez, modular la función inmune. El fenómeno se comprueba tanto por la administración de hormonas y neuropéptidos a animales, para después controlar las variaciones de su respuesta inmunitaria, como por la aplicación de distintos modelos de comportamiento

animal (condicionamiento y aprendizaje en situaciones diversas) en las que se supone están implicados diversos neuropéptidos como mediadores de las señales específicas.

Así se ha comprobado que el péptido intestinal vasoactivo (VIP) es capaz de modular el acceso de linfocitos a los nódulos linfáticos mesentéricos y a las placas de Peyer (OTTAWAY y GREENBERG, 1984), y que péptidos neuroentéricos (PN) como la sustancia P (SP) o la somatostatina (SOM) son capaces de regular la liberación de histamina y β -endorfina en mastocitos peritoneales (STANISZ y col., 1986). Son interesantes algunos experimentos de aprendizaje asociado con reflejos condicionados que pueden afectar a la frecuencia de precursores de células citotóxicas para el rechazo de injertos (GORCZYNSKI y col., 1982).

Se ha dicho que los efectos inmunológicos del estrés, coincidiendo con la liberación de adrenocorticotropina (ACTH) y de glucocorticoides, puede originar efectos inmunosupresores, que van acompañados por la involución del timo, bazo y nódulos linfáticos, junto con una apreciable leucopenia (PLOTNIKOFF y col., 1986). Estos fenómenos, que según los autores citados, no se aprecian en animales adrenalectomizados; lo que parece señalar a los esteroides adrenales como primer factor en producir el efecto inmunodepresor.

Existen muy variados **métodos de producir estrés**, y no sólo los factores de carácter psicosocial son capaces de influir en la inmunocompetencia, sino que también la infección por microorganismos o incluso la agresión con antígenos no autorreplicativos son capaces de provocar situaciones de **estrés** que van acompañadas de una elevación plasmática de los niveles de glucocorticoides (WEXLER y col., 1957; MELBY y col., 1960; BESEDOWSKY y col., 1979). También es posible crear situaciones de estrés quirúrgico por amputación de un miembro, en las que se observa una supresión de la actividad citotóxica natural durante un periodo superior al de la anestesia (POLLOCK y col., 1987) Todo ello nos conduce al concepto psicosomático de enfermedad, en el que la personalidad del individuo y sus

características psicológicas pueden jugar un papel causal en la etiología de la enfermedad por la correlación autonómica y hormonal.

Existen varios ejemplos de esta sumisión de enfermedades inmunes a influencias nerviosas, encontrándose una significativa depresión de la reactividad linfocitaria en esquizofrénicos, alteraciones depresivas o demencias como la enfermedad de Alzheimer (SOLOMON, 1981). También aparecen disminuciones en respuestas de inmunidad celular en pacientes con cuadros agudos de enfermedad vascular (CZLONKOWSKA y col., 1979), con tumores cerebrales (BROOKS y col., 1972) y con lesiones en diferentes áreas del hipotálamo (KELLER y col., 1980; ROSZMAN y col., 1982).

Según datos experimentales de RENOUX y su escuela, muchos de ellos incluidos en la revisión del tema efectuado por uno de sus colaboradores (NEVEU, 1988), queda suficientemente demostrado que la influencia moduladora del cerebro sobre las funciones del sistema inmune está sometida a una lateralización hemisférica a nivel del neocórtex cerebral. Así se ha descrito una asociación entre la destreza de la mano izquierda (individuos zurdos) y varias enfermedades autoinmunes (GESCHWIND y BEHAN, 1982). Estudiando la destreza de ratones y ratas para tomar el alimento, puesto que está comprobado que preferentemente utilizan tan sólo una de las extremidades anteriores, se ha tenido evidencia de que el grado de proliferación linfocitaria depende también del comportamiento (NEVEU, 1988). En los experimentos de RENOUX y col. (1983) se realizaron lesiones importantes en el neocórtex, afectando a distintas áreas; se comprobó que lesiones en la zona frontoparietal izquierda conducían a una inmunodepresión de distintas funciones de los linfocitos T, mientras que lesiones del córtex derecho iban acompañadas por un aumento de las mismas funciones en estas células T.

Así parece que en todas estas interrelaciones entre los sistemas nervioso e inmune -dos complejíssimos sistemas homeostáticos- en los que hormonas del eje hipotálamo-hipofisario actúan a través de receptores de linfocitos, la modulación podría estar

controlada de una forma lateralizada de acuerdo al funcionamiento de las estructuras del neocórtex y según sus conexiones derecha e izquierda, propiciada por una asimetría en la distribución de neurotransmisores que condicione la lateralización de esta regulación neuro-inmunitaria. En efecto, se ha observado que el hemisferio izquierdo es dominante sobre el derecho para el control del habla y la destreza manual (DIMOND y BLIZARD, 1987; HARNARD y col.,1977), mientras que el derecho es más importante en la expresión del afecto (GALIN, 1974; GAINOTTI, 1972) de acuerdo con la heterogénea distribución hemisférica de los neurotransmisores (PALKOVITS y col.,1979; PALKOVITS y BROWNSTEIN, 1985).

1.3.2. Sistemas monoaminérgicos, estrés y respuesta inmune

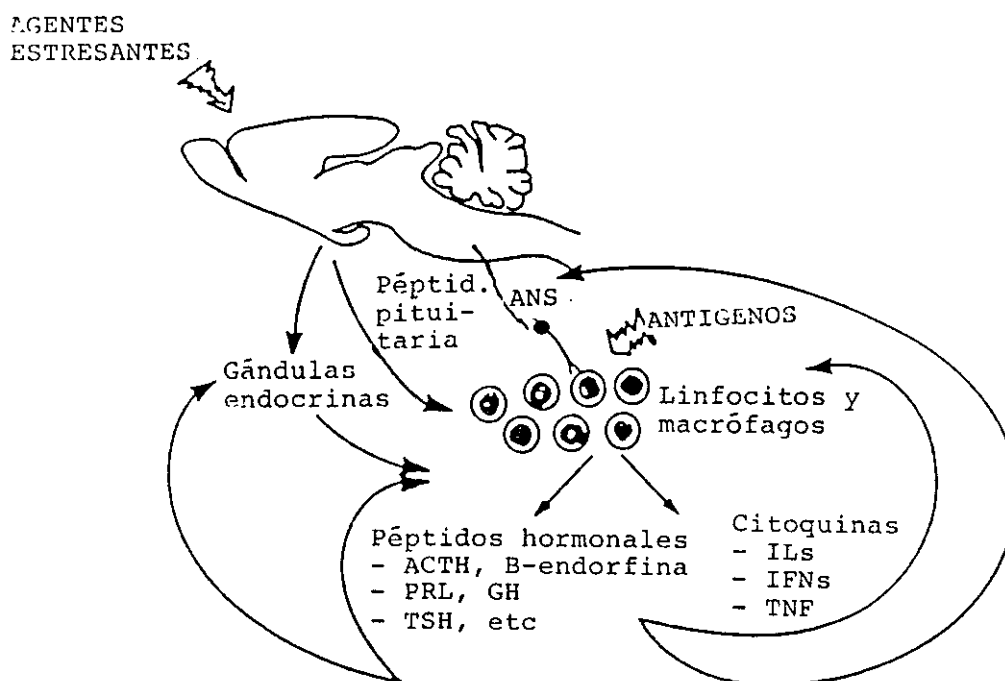


Fig. 8.-Representación esquemática de la comunicación bidireccional entre los sistemas nervioso e inmune en una situación de estrés.

Todavía no se conoce cuál es el verdadero mecanismo, ni la molécula exacta que indica al SNC que se ha producido una alteración inmunitaria. En nuestra opinión, admitiendo como cierto que el sistema inmune también interviene en estas respuestas de estrés nos cabe pensar que son diversas las rutas moleculares que coordinan ambos sistemas: nervioso e inmune. Así, situaciones de estrés biológico, creadas por una reacción frente a un agresor infeccioso pueden ir acompañadas, no sólo por aumentos de glucocorticoides (WEXLER y col., 1957; MELBY y col., 1960), sino también por incrementos en el recambio de catecolaminas en el cerebro y en la periferia (BESEDOWSKY y col., 1979; DUNN y col., 1987). De igual modo, a los pocos días de iniciar una inmunización, es

posible comprobar una disminución en el contenido de norepinefrina existente en el bazo, a la vez que aumenta el número de células sintetizadoras de anticuerpos específicos (BESEDOWSKY y col.,1979. Esta situación está de acuerdo con el hecho de que los niveles de respuesta por anticuerpos específicos aumentan por efecto de agentes α -adrenérgicos (SANDERS y MUSON, 1985) o se reducen cuando se produce una simpatectomía farmacológica (LIVINAT y col.,1985). Con todo ello se demuestra una comunicación bidireccional entre los sistemas nervioso e inmune, así como su participación conjunta en situaciones de estrés (Fig. 8 y Tabla II).

Por otra parte, también se ha comprobado que en situaciones determinadas, el sistema inmune es capaz de producir ACTH y otros neuropéptidos que conducen a la liberación directa de glucocorticoides a partir de la corteza adrenal (SMITH y col.,1982). Dichas moléculas actúan, probablemente, como factores paracrinós o autocrinós sobre acontecimientos mediatizados por linfocitos y macrófagos (DANTZER y KELLEY, 1989), como lo prueba el hecho de que una hormona estimuladora de melanocitos y derivada de la pro-opiomelanocortina (α -MSH), sea capaz de actuar como antagonista frente a la IL-1 liberada por los macrófagos (MASON y VAN EPPS, 1989). Se sabe que las células gliales del cerebro pueden sintetizar y secretar IL-1, pero no se conoce por qué la inyección sistémica de IL-1 aumenta la excreción del factor liberador de corticotropina, dado que ésta y otras citoquinas son grandes moléculas proteicas y es poco probable que atraviesen la barrera hematoencefálica en cantidad suficiente como para alcanzar concentraciones elevadas dentro del SNC (COCEANI y col.,1988). El hecho de que se desconozca el mecanismo exacto por el cual la IL-1 estimula la liberación de ACTH y glucocorticoides (BERKENBOSCH y col.,1987; SAPOLSKY y col.,1987) y los efectos neurotóxicos secundarios de los distintos mediadores solubles de la inmunidad, capacez de producir hipoglucemia, pérdida de apetito, debilidad, letargo, etc. (FENK y ZBINDEN, 1987; TOBLER y col.,1984; PLATA-SALAMA y col. 1988) hace que sea muy limitada la utilidad clínica de

TABLA II.- Inmunomodulación mediada por acetilcolina y catecolaminas.

NEUROTRASMISOR	RECEPTORES IDENTIFICADOS	Efectos en la función del sistema inmune.
I. ADRENALINA	Tipo β en: Linfocitos granulocitos y mastocitos.	Inhibición de la reacción cutanea y liberación de mediadores histanín-dependientes. Descenso de respuesta proliferativa a mitógenos y antígenos. Inhibición de citotoxicidad en macrófagos. Efectos variables en formación de anticuerpos, circulación de linfocitos, y células NK.
NORADRENALINA	Tipo β en: Linfocitos granulocitos y mastocitos.	Inhibición de liberación de histamina y desgranulación de mastocitos. Inhibición de citotoxicidad en macrófagos y de respuesta linfocitaria a LPS. Incremento de la producción de anticuerpos.
II. ACETILCOLINA	Muscarínicos: Linfocitos y macrófagos. Nicotínicos: Timo.	Estimulación de respuestas alérgicas, formación de rosetas E, respuesta a PHA, y citotoxicidad de Linfocitos T. Activación de la síntesis del complemento en Monocitos humanos.

las diversas citoquinas recombinantes obtenidas por ingeniería genética.

I.3.3. Neuropeptidos opioides y respuesta inmune en situaciones de estrés

Existe evidencia de que los péptidos opioides no son únicamente una clase distinta de neurotransmisores, como en principio se creía, sino que intervienen en otras muchas funciones fisiológicas cuyo mecanismo de acción no está aún perfectamente conocido. Las dificultades para su completo conocimiento radican en que algunos péptidos tienen una cinética de acción lenta o retardada en cuanto a la transmisión de su señal (IVERSON, 1984), que existe confusión o errores en las distintas localizaciones de un péptido y sus receptores específicos (HERKENHAM y Mc LEAN, 1986), y que muchos neuropeptidos coexisten con agentes neurotransmisores clásicos en neuronas individuales (LUNDBERG y HOKFELT, 1983). Todo ello apoya la teoría de que los neuropeptidos pueden también actuar en procesos de neuromodulación de la respuesta inmune, donde la acción requiere un curso lento de localización más difusa y con capacidad para modificar el efecto de los transmisores (Mc EWEN y PFAFF, 1985).

En cuanto al papel de los péptidos como neuromoduladores (ver rev. de KOW y PFAFF, 1988), alcanza desde respuestas a nivel subcelular hasta modificaciones del comportamiento y pueden afectar tanto a funciones autonómicas como endocrinas, la temperatura corporal, la liberación de hormonas que a su vez puede desencadenar una cascada de efectos fisiológicos o patológicos, etc.

Los mecanismos de modulación por neuropeptidos incluyen **alteraciones a nivel de unión del transmisor** por producirse cambios tanto en el número de receptores como en su afinidad. Aún más, un determinado neurotransmisor puede unirse a distintos tipos de receptores que existen en neuronas individuales del hipotálamo y son capaces de mediar diferentes acciones (KOW y PFAFF, 1987; TONNAER y col.,1986). También muchos

péptidos son capaces de actuar por **modificaciones en la intervención de un segundo mensajero**, ya sea adenilato ciclasa-AMPC o bien otros mecanismos **alterando la transducción de señales** con participación de distintos fosfolípidos de membrana, como el fosfatidil inositol (**IP₃**) (REDGATE y col.,1986; MAGISTRETTI y SCHORDERET, 1984; SHAPIRA y col.,1987). Incluso sin producir cambios de especificidad, existen péptidos capaces de producir una **modificación en el potencial de membrana** (MUDGE y col.,1979; ONO y FUKUDA, 1982); o introducir **alteraciones en la regulación de canales iónicos**, que modifican la excitabilidad eléctrica, los patrones de conductividad, la duración de la excitación, etc. (WERZ y Mc DONALD, 1983; MUDGE y col.,1979); o también intervenir en una **interacción de células gliales y neuronas** con modificación del AMPC glial (ROUGON y col.,1983).

Las alteraciones de carácter competitivo a nivel de receptor, ya sea modificando la afinidad o bien produciendo interacciones alostéricas, o por variaciones en la interacción receptor-ligando, nos conducen a la posible participación de los neuropéptidos en la modulación de la respuesta inmune (O'DORISIO, 1987); y de hecho, se ha comprobado "*in vitro*" que existen neuropéptidos opioides capaces de modificar diversas actividades linfocitarias (WIBRAN, 1985), lo que podría representar una importante relación entre los sistemas nervioso e inmune.

Desde que WIBRAN y col. (1979) informaran sobre la presencia de receptores para morfina y metionil-encefalina en linfocitos T de sangre periférica humana, y se empezaran a comprobar los efectos de las moléculas opioides sobre células del sistema inmunitario, son muchos los datos existentes sobre la actividad funcional y su significación fisiopatológica, aunque quedan aún muchas incógnitas por resolver. Según los datos revisados por SIBINGA y GOLDSTEIN (1988), la caracterización de los efectos opioides sobre el sistema inmune viene definida por las posibilidades de bloquearlos mediante un antagonista como la naloxona. Según los distintos experimentos ensayados se han

comprobado modificaciones en: a) respuestas linfoproliferativas; b) síntesis de linfoquinas; c) síntesis de anticuerpos específicos; d) actividad citotóxica de células NK; e) acción quimiotáctica de polimorfonucleares; f) producción de superóxidos por los macrófagos; y g) lo que es de más particular interés para este trabajo, como es el efecto sobre mastocitos, que incluye incrementos en la unión del calcio a la membrana, prevención de los efectos inhibidores producidos por varios agentes sobre la liberación de serotonina IgE-estimulada y producción de una respuesta inflamatoria edematosa por inyección intradérmica.

Desde el punto de vista inmunopatológico, neuropéptidos opioides tales como la dinorfina, aparecen también implicados en la formación de tumores, puesto que según observaron VASWANI y col., (1986), los niveles de esta molécula en el hipotálamo e hipófisis descienden durante la formación de tumores mamarios en ratas, mientras que altos niveles de dinorfinas han sido encontrados en tejidos tumorales por BRYANT y col. (1985). Por otra parte, también es interesante en la relación peptido-opioide y sistema inmune, el hallazgo de que pacientes de esquizofrenia responden favorablemente al tratamiento con β -endorfina y que la mejoría es más acusada en aquellos individuos cuyos antígenos HLA-I pertenecen a la clase B13, B15 o B22; esto hace suponer a los autores que la esquizofrenia puede ser una enfermedad autoinmune que afecta a los antígenos de histocompatibilidad HLA-I (De JONGH y col., 1982; CLAAS y col., 1986). Posteriormente se han descrito otras alteraciones genéticas en relación con la enfermedad.

El hecho de que algunos neuropéptidos puedan interactuar con ACTH (TONNAER y col., 1986) o con noradrenalina (MAGISTRETTI y SCHORDERET, 1984), ya hace suponer una posibilidad de intervención de los péptidos opioides en situaciones de estrés agudo, tal como señalaron hace unos años ROSSIER y col. (1977).

Efectivamente, se han descrito varias situaciones en las que se observan interacciones de este tipo por estímulos agresivos, como el shock por lesión en las

extremidades, inmersión continuada, ejercicio físico exhaustivo, en ciertos momentos de la gestación y parto, o durante una hipoglucemia inducida experimentalmente, en las que se producen marcados aumentos de los niveles de endorfinas circulantes, liberadas a partir de la adenohipófisis junto con adrenocorticotropina. Estas moléculas van a actuar sobre los receptores específicos existentes en monocitos, linfocitos y granulocitos de la sangre periférica y su efecto se traduce, generalmente, por una inmunosupresión a distintos niveles (rev. por SIBINGA y GOLDSTEIN, 1988). Algunos datos encontrados en la bibliografía parecen demostrar que la mayoría de estas modificaciones de inmunidad celular pueden producirse a nivel de la síntesis de distintos factores mediadores; así, es probable que el efecto inhibitor de la quimiotaxis leucocitaria sea debido a la supresión de un factor quimiotáctico producido por los linfocitos T (BROWN y VAN EPPS, 1985). Este efecto, en ocasiones, puede ser mediatizado por indometacina y no ser bloqueado por naloxona, lo que pone de relieve la afirmación de HAZUM y col. (1979) de que existen receptores en los linfocitos que, aún siendo específicos de las β -endorfinas, son distintos de los típicos receptores opiáceos, y son capaces de influir en algunas funciones neuroinmunomoduladoras a nivel central y periférico.

Existen otros niveles de inmunomodulación por neuropéptidos de carácter morfomimético, tanto a nivel de los terminales de fibras del sistema nervioso periférico - particularmente sobre los mecanismos involucrados en el sistema simpático- como a nivel del SNC en conexión con el endocrino. Estos efectos, que aparecen más relacionados con modificaciones del comportamiento, pueden ser antagonizados por naloxona y naltrexona. Son de señalar, en este caso, las variaciones por un comportamiento de agitación anímica excesiva (GISPEN y col.,1976), los cuadros catatónicos por veneno de cobra (BLOOM y col.,1976) y los estados de sedación profunda y catalepsia (JACQUET y MARKS, 1976). Efectos, estos últimos, que posiblemente están relacionados con los efectos opiáceo-endorfinoides del interferón obtenidos en leucocitos humanos y que fueron observados por

BLALOCK y SMITH (1981) cuando inyectaron IFN intracerebralmente a ratones. Estos efectos incluyen analgesia, falta de locomoción espontánea y catalepsia, y son evitables e incluso reversibles por naloxona. Dichos autores, aparte de suponer analogías estructurales entre IFN y endorfinas, sugieren la existencia de un circuito regulador inmuno-neuroendocrino que pudiera constituir la diana etiológica de ciertos estados psicopatológicos.

Este efecto modulador de las beta-endorfinas sobre la función inmune, alcanza también a las reacciones de hipersensibilidad, por su acción sobre los mastocitos, con una rápida liberación de histamina (SYDBOM, 1988); y dicho efecto particular será revisado con más detalle en el apartado que sigue, por sus implicaciones con la anafilaxia y el shock endotóxico.

I.4.- NEUROINMUNOMODULACION EN CUADROS DE HIPERSENSIBILIDAD Y ANAFILAXIA. SU VARIACION EN SITUACIONES DE ESTRES.

Las distintas respuestas de un organismo sensibilizado, frente a un antígeno sensibilizante, pueden ser agrupadas en cuatro tipos diferentes de reacción dependiendo de: a) el intervalo de tiempo entre el momento de sensibilización y la aparición de los síntomas; b) la naturaleza humoral o celular de la reacción inmunobiológica; y c) las dianas celulares o tisulares involucradas en el proceso reactivo. La diversidad en cuanto a mecanismo, diana biológica y tipo de reacción se resumen en la Tabla III, aunque sin descender a los detalles más íntimos de cada proceso, puesto que nuestro interés se centra fundamentalmente en el fenómeno anafiláctico y en la posible respuesta inflamatoria subsiguiente.

Los mecanismos de interacción neuroinmune en dichas reacciones están aún poco aclarados, y particularmente aquellos en los que un mediador es capaz de estimular o

TABLA III.- COMPARACION ENTRE DIFERENTES TIPOS DE HIPERSENSIBILIDAD

Clasificación	TIPOS	I	II	III	IV	V
	Sinonimia	Anafilactica H. inmediata Anafilaxia	Citotoxica	Complejo-mediada H. ligada a com- plejos inmunes	Celulo-mediada H. retardada H. por media- ción celular	Autoinmunitaria Estimuladora
Elementos que intervienen	Antígeno	Usualmente exógeno (polen, polvo, mohos, etc)	Superficie celular	Extracelular	Extracelular o superficie celular	Superficie celular
	Anticuerpo	Hemocitotropico unido a mastoci- tos	Humoral	Humoral	Receptor sobre linfocito T	Humoral
	Participación ocasional del complemento	No	Si	Si	No	No
	Transferencia por	IgE y según la especie	IgG e IgM	IgG, IgM e IgA (?)	Células linfoides, factor de transferencia	Anticuerpos del suero
Respuesta al anti- geno intradérmico	Reacción máxima	30 min	--	3 - 8 h.	24 - 48 h.	--
	Aparición	brusca e intensa	--	Eritema y edema	Eritema e induración	--
	Histología	Mastocito degra- nulados: edema; eosinofilos	--	Reacción inflama- toria aguda, PMN	Inflamación perivascular; PMN; predominan monocitos	--
Cuadros clínicos típicos	Alergia atópica (fiebre del heno coriza espasmódica)	enfermedad hemolítica del recien nacido (Rh)	Glomerulo nefritis pulmon de Farmer	Reacción de Matoux a B. Koch; rechazo de homotransplantes	Tirotoxicosis	

inhibir la formación o actividad de otro, que también participa en la reacción inflamatoria o en el cuadro de shock por anafilaxia. Una reacción de hipersensibilidad es un proceso dinámico en el que el conjunto de células y factores que intervienen cambia continuamente. Como puede verse en la Tabla III, las reacciones de hipersensibilidad, tanto la inmediata como la retardada, pueden ser transferidas a un huésped no sensibilizado mediante el suero (en la inmediata), o mediante las células (en la retardada), procedentes de individuos previamente sensibilizados.

En la íntima comunicación bidireccional existente entre los sistemas nervioso e inmune se han encontrado más de treinta moléculas, entre hormonas y neurotransmisores, que son capaces de transmitir mensajes e influir decisivamente sobre el sistema inmune. Si a esto unimos la complejidad de los mecanismos de reacción anafiláctica, en los que intervienen como mediadores no sólo aminas vasoactivas sino también neuropéptidos opioides activos para modular las reacciones de shock, habremos de encontrar justificada la enorme dificultad que supone conocer la naturaleza de los cambios que se pueden producir en la reacción anafiláctica en situaciones de estrés y en su modulación.

Se ha comprobado que la magnitud de los efectos producidos por los glucocorticoides adrenales, que son moléculas involucradas en la implantación de un cuadro de estrés, depende de circunstancias relacionadas con la naturaleza del agente estresante y el momento en que éste actúe. Aunque existen pocos datos en relación con el problema de hipersensibilidad en situaciones de estrés, BLECHA y col.(1982; 1982a), estudiando distintas reacciones de hipersensibilidad de contacto, encuentran que un aumento en el nivel plasmático de corticosteroides, producido por distintos mecanismos de estrés como inmovilización, calor o frío, tiene distintas resultantes según que el fenómeno se mida como una hipersensibilidad retardada frente a hematies de carnero o como una respuesta de sensibilidad de contacto a dinitrofluorobenceno.

En relación con los neuropéptidos parece que existen más antecedentes relativos a los efectos neurales directos e indirectos sobre la expresión de respuestas de hipersensibilidad inmediata. Se ha comprobado que las endotoxinas estimulan la liberación de ACTH y β -endorfinas, y existen indicios de que la hipotensión, subsiguiente al cuadro de shock endotóxico, es parcialmente debida a la participación de endorfinas (FADEN y HOLADAY, 1980). En este fenómeno puede estar involucrada la liberación de histamina a partir de mastocitos, producida por dinorfina y otros péptidos con secuencias ARG-PRO en su molécula (SYDBON y TERENIUS, 1985). Esta liberación de histamina a partir de mastocitos peritoneales por efecto de β -endorfina es dosis-dependiente y muy rápida, se completa en diez segundos, y con un perfil farmacocinético semejante al observado con otros péptidos tales como neurotensina, dinorfina y sustancia P (SYDBON, 1988).

La liberación de histamina, que también es producida por otros neuropéptidos procedentes del sistema nervioso periférico y del sistema nervioso central (CASALE y cols., 1984), puede producir algunos efectos indirectos, como sucede con el péptido P que condiciona una dilatación microvascular a nivel cutáneo que se inhibe por tratamientos previos con antagonistas H_1 (FOREMAN y JORDAN, 1983).

El hecho de que durante el estrés se liberen simultáneamente encefalinas y catecolaminas en la corriente sanguínea (HANBAUER y col., 1982) y el que estas sustancias tengan una actividad moduladora sobre distintas células inmunocompetentes, por existir en ellas receptores específicos no opiáceos (HAZUM y col., 1979; LOPKER y col., 1980), nos lleva a pensar una vez más en la versatilidad de respuestas que pueden encontrarse, dependiendo de las condiciones experimentales que se utilicen.

I.5. MODIFICACIONES FARMACOLOGICAS DE LA INTERACCION NEUROINMUNE EN LOS CUADROS DE ANAFILAXIA.

Entre los distintos sistemas moduladores de la interacción neuroinmune que pueden intervenir en las respuestas de hipersensibilidad, existen tres particularmente importantes, al menos desde nuestro punto de vista, el histaminérgico, el serotoninérgico y el opioide.

La **HISTAMINA** (5-β-imidazolil-etil-amina), se produce a partir de la histidina mediante la actividad del enzima histidín-descarboxilasa existente en células basófilas y mastocitos, encontrándose en unos gránulos intracelulares en forma de complejo con grupos carboxilos de moléculas de proteoglicano (LANGUNOFF, 1980). En ausencia de procesos de activación celular, el recambio histamínico en las células periféricas es lento o inexistente, al contrario de lo que sucede en el SNC y en el tracto gastrointestinal, donde tiene lugar un recambio substancial de esta amina vasoactiva (PLAUT y LICHTENSTEIN, 1978). En respuestas de hipersensibilidad inmediata, la histamina es menos activa que otros mediadores como los leucotrienos (LTD₄, LTB₄), anafilotoxinas (C₅a) y el factor activador plaquetario (FAP), y por ello necesita altas concentraciones locales para producir efectos significativos "in vivo". El metabolismo de la histamina es rápido y en él intervienen una metil-transferasa (existente en monocitos) y una monoaminooxidasa que la transforma en 3-metil-imidazol,5-acético; sobre la histamina restante actúa una diaminoxidasa (histaminasa, existente en neutrófilos y eosinófilos) que la convierte en imidazol-5-acético y después en ribosilimidazol-5-acético (PLAUT y LICHTENSTEIN, 1978): todos estos metabolitos son rápidamente excretados por vía urinaria.

La importancia de la histamina en fenómenos anafilácticos sistémicos y localizados varía extraordinariamente en función de la especie animal de que se trate. Así, por ejemplo, los ratones son bastante resistentes a la acción de la histamina, en tanto que los cobayos son muy sensibles. En humanos, la histamina juega un importante papel en las respuestas edematosas de la piel y en rinitis alérgicas, que responden perfectamente a los

antagonistas H_1 , mientras que son inefectivos en asmáticos (PARKER, 1980). Esto hace pensar que, en este último caso, existen otros mediadores más importantes como sucede en cuadros de anafilaxia sistémica (SMITH y col.,1980), donde es posible que algunos efectos de la histamina estén asociados en parte al de otros mediadores, incrementándose la síntesis de PGE_2 y PGF_2 , que son más activos como broncoconstrictores que la propia histamina. También en los fenómenos anafilácticos producidos por activación del Complemento, se produce liberación de histamina por efecto del los fragmentos C_{3a} , C_{4a} y C_{5a} .

Los diversos efectos de la histamina estan condicionados al tipo de receptor sobre el que actúa; así cabe distinguir la actividad sobre vasos sanguíneos y piel, durante las reacciones de hipersensibilidad inmediata, que son efectos de carácter pro-inflamatorio y dependen de receptores H_1 (KNIKER y COCHRANE, 1968), requiriéndose concentraciones más elevadas de histamina. Es probable, además, que el efecto condicionante de la histamina sobre el endotelio vascular, en casos de vasculitis, y que afecta a su permeabilidad y al depósito de inmunocomplejos, sea también producido por medio de receptores H_1 . Este efecto sobre los pequeños capilares y la migración de leucocitos aumentaría las respuestas mediatizadas por la células T, al contrario de los fenómenos de inmunosupresión observados "in vitro" (PLAUT y LICHTENSTEIN, 1978).

La histamina, actuando directamente sobre la función leucocitaria y la migración, es capaz de inhibir la proliferación de las células T inducida por lectinas o antígenos, así como la liberación de linfoquinas, las actividades citotóxicas y la diferenciación de las células B. En general, estas acciones sobre leucocitos son bloqueadas por antagonistas de los receptores H_2 de histamina, pese a que su demostración sobre macrófagos (ROSNER y col.,1979) y timocitos (OSBAND y Mc CAFFREY, 1979) resulta controvertida. Este efecto sobre los receptores H_2 de células inmunocompetentes requiere concentraciones histamínicas de orden $10 \mu M$ o más altas, produciendo la actividad inhibidora de la

respuesta inmune a través de células T supresoras, lo que hace suponer su intervención en los mecanismos de control de las respuestas celulares (ROCKLIN, 1976; ROCKLIN y col.,1979). Se ha comprobado que la incubación de células T con histamina en presencia de monocitos libera una linfoquina capaz de promover una supresión inespecífica (ROCKLIN y col.,1979; 1980).

Más recientemente, a nivel de terminales nerviosos histaminérgicos, se ha descubierto otro tipo de receptores de histamina -los receptores H₃- que son capaces de inhibir su propia síntesis y liberación en cortes de tejido cerebral, por un proceso de retroalimentación negativa a nivel de los terminales histaminérgicos (ARRANG y col.,1983; 1985; 1987). El hecho de que este tipo de receptores esté presente también en los mastocitos pulmonares, hace que un agonista del receptor H₃ como la alfa-metil-amina, pueda encontrar aplicación terapéutica en enfermedades alérgicas (ARRANG y col.,1987).

Dado que en el cerebro, además de existir neuronas histaminérgicas (GARBARG y col.,1974), se encuentran células cebadas con alto contenido de histamina que se asocian a vasos, meninges y parénquima cerebral (KRUGER, 1974), es de suponer que la histamina tenga también algunos efectos en el comportamiento, y que éstos lleguen a afectar a las situaciones de estrés en casos de anafilaxia donde hay liberación de histamina. No hemos encontrado antecedentes en relación con esta situación, pero sí se ha comprobado que la inyección intracerebroventricular de 100 y 200 µg de histamina, en ratas, es capaz de modificar su comportamiento, reduciendo su capacidad de aprendizaje por disminución de la capacidad de atención, de motivación y de motilidad (RIAL y col.,1986).

La **SEROTONINA** (5-OH-Triptamina), se produce a partir del hidroxitriptófano por acción de una carboxilasa inespecífica, se encuentra principalmente en las plaquetas y células enterocromatófilas del tracto gastrointestinal. Se cataboliza rápidamente por monoaminoxidasas presentes en células endoteliales del pulmón y otras vísceras, y se

transforma en hidroxifenilacético (HO y col.,1979). En muchas especies animales tiene efectos similares a la histamina sobre la permeabilidad capilar y contracción de la fibra lisa, aunque no sea particularmente potente, sobre todo cuando se compara con la acetilcolina como espasmogénico (BROCKLEHORST, 1958). Sus efectos son significativos en reacciones de hipersensibilidad inmediata en ratones y ratas, y también en cuadros de anafilaxia sistémica en conejos (SULLIVAN y KULCYCKI, 1980; DOUGLAS, 1975). Resulta interesante el hecho de que la susceptibilidad local de la piel a respuestas de hipersensibilidad retardada, sobre todo en ratones y ratas, esté mediada por el contenido serotoninico de los mastocitos, siendo insensible a histamina. De aquí que estas reacciones sean bloqueadas por reserpina y ciproheptadina, pero no por los antihistamínicos (ASKEMASE y col.,1980). En estas reacciones la mayor parte de la serotonina se libera a las 6 horas o más, después de administrar el antígeno sensibilizante, y en el fenómeno es probable que intervenga una linfoquina producida por las células T sensibilizadas, más que la propia reacción directa antígeno-dependiente. La serotonina aumenta también los estímulos quimiotácticos y es probable que esto ocurra a través de aumentos de GMP_c (SANDLER y col.,1975; FOON y col.,1976). Tanto la serotonina como la histamina, intervienen en la expresión de la encefalomiелitis autoinmune experimental, en la que el coadyuvante puede actuar incrementando la sensibilidad de los vasos sanguíneos a la histamina y serotonina. En este modelo animal, los antagonistas de serotonina son capaces de inhibir los síntomas de encefalomiелitis (LINTHICUM e FRELINGER, 1982).

En el estudio de inmunomoduladores, se ha comprobado que moléculas procedentes de la pared celular bacteriana, como algunos muramil-péptidos (MDP), tienen efectos que evidentemente están relacionados con el SNC, como son los que afectan al control del dolor, sueño y temperatura corporal (FILLION y col.,1988). Según se ha demostrado por investigaciones bioquímicas, el MDP a dosis capaces de estimular la respuesta inmune, puede incrementar también de un modo significativo el recambio de

serotonina en varias regiones del cerebro; lo que sugiere que se produce una activación de las estructuras serotoninérgicas, coincidiendo con cambios en la temperatura, sueño y resistencia al dolor (MASEK y KADLECOVA, 1987). Estudiando respuestas de estructuras serotoninérgicas específicas correspondientes al hipotálamo, se ha comprobado que al producir lesiones eléctricas en las estructuras serotoninérgicas B6, B7 y B8, hacen que el MDP potencie marcadamente las respuestas de hipersensibilidad retardada (MASEK y col., 1985).

Esta intervención del sistema serotoninérgico en la neuroinmunomodulación puede extrapolarse también a las situaciones de estrés, puesto que se ha comprobado que la supresión de respuestas inmunitarias por una situación prolongada o repetida de estrés en ratas, aparece asociada a incrementos del metabolismo de serotonina (BORANIC y col., 1982). Esto confirma la hipótesis de DEVOINO y col. (1979), sobre que las rutas serotoninérgicas centrales (especialmente las del hipotálamo), intervienen en el control de la respuesta inmune a nivel del organismo entero. BORANIC y col. (1984) han comprobado, en ratas inmunizadas frente a hematíes de carnero y posteriormente sometidas a situaciones de estrés, que se produce una potenciación en la inmunosupresión inducida por el estrés, y que ésta va acompañada por un incremento del metabolismo de la serotonina en el cerebro. Cuando en estos casos se trataba a los animales con p-clorofenilalanina, seguía existiendo inmunosupresión, aunque se observaba una disminución en los niveles de serotonina y se aumentaban los niveles plasmáticos de corticosterona. Parece como si este inhibidor de la síntesis de serotonina evitara una participación de la regulación serotoninérgica a través del SNC por medio de un aumento en la secreción de corticosterona, que va a actuar sobre las células linfoides.

Los **PEPTIDOS OPIOIDES ENDOGENOS** constituyen una subclase particular de los neuropéptidos, tienen una función reguladora y presentan una localización que alcanza tanto a los tejidos periféricos como al SNC (HOLADAY, 1983). Poseen una actividad

fisiológica extraordinaria a concentraciones de varios órdenes de magnitud por debajo de aquellas a las que actúan las hormonas clásicas y algunos transmisores tales como la acetilcolina y las monoaminas (BLOOM, 1984; KRIEGER, 1983). El nombre genérico de neuropéptidos, con frecuencia resulta condicionado a la función específica de su descubrimiento inicial en relación con tejidos nerviosos. En las situaciones de estrés, no sólo actúan los péptidos opioides sino que pueden participar también otros neuropéptidos relacionados con la β -endorfina a nivel hipotálamo-hipofisario (TRH, ACTH, prolactina); o con las encefalinas, por su distribución coordinadora cerebro-intestino (glucagón, PIV, sustancia P, colecistoquinina); o con la dinorfina, por su intervención en la neuro-hipófisis (vasopresina, oxitocina, neurotensina). Sin embargo, tan sólo se conocen agonistas y antagonistas exógenos para los péptidos opioides y sus receptores, de aquí que sean los más conocidos farmacológicamente al poder bloquearlos o activarlos a voluntad en sus actividades endógenas, particularmente en lo que se relaciona con la fisiopatología cardiovascular (HOLADAY 1983).

En vista de que en situaciones de estrés se activan los sistemas opioides y de que las sobredosis de narcóticos (opioides exógenos) provocan signos que semejan a un shock circulatorio, parece posible que estos sistemas opioides endógenos puedan intervenir también en la fisiopatología de algunas formas de shock. Más aún cuando se ha podido demostrar que la naloxona es capaz de bloquear o revertir el cuadro hipotensivo que se produce en un shock endotóxico (HOLADAY y FADEN, 1978), y también de modificar la intensidad de respuesta en otros tipos de shock, incluso en el anafiláctico, donde hay una participación del sistema inmune (GURLL, 1983). Experimentos realizados por HOLADAY (1983) con naloxona, demuestran que el sistema opioide contribuye, desde el SNC, al desarrollo del shock séptico; mientras, el hipotálamo anterior, el locus cerúleus y porciones nucleares aisladas son los que participan en el shock cardiovascular (HOLADAY, 1983; JANSSEN, 1983).

La manipulación farmacológica de las respuestas opioides presenta una complicación adicional por la existencia de varios receptores específicos que dan lugar a un amplio espectro de actividades agonistas (MARTIN y col.,1976). De ellos, los **receptores μ** son los mejor caracterizados e intervienen en analgesia, euforia, depresión respiratoria, catalepsia y miosis; siendo la β -endorfina el opioide endógeno con mayor potencia sobre estos receptores μ y la morfina el ligando prototipo para dichos receptores. Los **receptores lambda** tienen muchas acciones similares, aunque es la leucil-enkefalina la que presenta mayor especificidad para este tipo de receptor. En cuanto a los **receptores k**, la dinorfina es el opioide que se considera como ligando específico de ellos. Resulta bastante complicado hacer una evaluación de los agonistas, antagonistas y agonistas parciales, en relación con el shock; por ejemplo, por la variabilidad de efectos sobre los distintos subtipos de receptores (ATWEH y KUHAR, 1983; ZUKIN y ZUKIN, 1982).

En general, podemos afirmar que los opioides endógenos juegan importantes papeles en una gran variedad de parámetros fisiológicos entre los que se incluyen: regulación del dolor, apetencia alimenticia, balances hormonales y respuestas al shock o al estrés. Sin embargo, el empleo de agonistas o antagonistas no siempre facilita una información cierta por la complejidad de interacciones con otros sistemas (WILSON y col.,1980; YARBROUGH, 1983), puesto que la función opioide ha sido citada en otros muchos tejidos no neurales (AKIL y col.,1984; SYNDER, 1984; MILLAN y HERZ, 1985).

En cuanto al efecto particular de los opioides en cuadros de shock anafiláctico, se ha comprobado que la naloxona y también con TRH, administrados por vía endovenosa, se disminuye bruscamente la mortalidad en respuestas anafilácticas frente a albúmina bovina (AMIR, 1984; 1984a). La ruta bioquímica por la que se produce este efecto protector periférico parece depender del flujo adreno-medular, puesto que se puede bloquear este efecto por un tratamiento previo con clorisondamina, por simpatectomía química o por una denervación adrenal bilateral.

Este tipo de estudios, en general, resulta complicado por la dificultad de medir los niveles del opioide circulante y por la confusión observada en la bibliografía entre efectos propiamente opioides y los no opioides (es decir, no bloqueados por naloxona). Entre estos últimos, son de destacar las interacciones de carácter no opioide de las β -endorfinas con linfocitos a través del grupo carboxi-terminal (HAZUM y col., 1979), con un componente del sistema complemento (SCHWEIGERER y col., 1982) o en otras situaciones en las que pueden funcionar como estimuladores o supresores de la proliferación linfocitaria (PLOTNIKOFF y col., 1985; GILMAN y col., 1982; MC CAIN y col., 1982).

Según GOETZL y col. (1985), los neuropéptidos mediadores de nervios sensoriales, cuando son liberados por un daño físico o químico, o por diversas agresiones biológicas -factores que pueden darse en cualquier situación calificable como angustiosa o de estrés-, son capaces de desencadenar rápidamente una respuesta local o sistémica semejante a aquellas que pueden darse en cuadros de hipersensibilidad inmediata. Entre estos efectos neurales cabe distinguir: a) los de acción directa sobre las funciones del músculo liso, vasos sanguíneos, leucocitos y glándulas epiteliales; y b) los efectos indirectos que se producen a través de mediadores liberados de los mastocitos después de su activación neuropeptídica.

I.6. - SOBRE LAS POSIBILIDADES DE MODELOS EXPERIMENTALES ADECUADOS.

Cualquier aproximación farmacológica al conocimiento de la neuroinmunomodulación en situaciones de estrés -sobre todo en relación con respuestas de sensibilización y anafilácticas- requiere una adecuada selección del modelo experimental a estudiar "in vivo". Es cierto que, por parte de distintas organizaciones protectoras de animales, se está produciendo una sensibilización social cada vez más acentuada frente a la investigación con seres vivos y ello hace que se vayan ideando bastantes modelos

alternativos para ensayos de toxicidad, por ejemplo (GOLDBERG y FRAZIER, 1989); pero también es una realidad, que para acometer una investigación referente al comportamiento animal en una reacción anafiláctica -situaciones en las que pueden intervenir reacciones cruzadas y diversas variaciones entre los distintos parámetros a considerar- es imprescindible establecer un cierto número de experimentos "*in vivo*" y "*ex vivo*" que permitan conocer la respuesta a nivel del animal completo, puesto que los ensayos "*in vitro*" con cultivos celulares, por ejemplo, nos darían tan sólo una versión muy parcial del problema.

1.6.1.- En relación con ciertos patrones de condicionamiento y aprendizaje.

Existen muchos y muy diferentes modelos animales para controlar las relaciones neuroinmunitarias. Así, diversos experimentos sobre inmunología del comportamiento, realizados por científicos canadienses, ponen de manifiesto cómo es posible: a) controlar la aversión por un sabor determinado (sacarina), dependiendo del estado de inmunosupresión producido por tratamientos con ciclofosfamida; b) modificar el equilibrio de opioides endógenos produciendo un shock por lesionar la cola de una rata; y c) alterar influencias neurohormonales en tejidos inmunitarios del tracto intestinal mediante distintos condicionamientos asociados al aprendizaje por respuestas de Pavlov y que pueden modificar la influencia de péptidos neuroentéricos sobre el sistema inmune (GREENBERG, 1986).

En relación con el papel inmunosupresor de peptidos opioides (endorfinas y encefalinas) son varios los modelos que se han aplicado, provocando situaciones de estrés por shock consecuente con lesiones en las extremidades (ROSSIER y col.,1977), por inmersión prolongada (WARDLOW y col.,1980), por exceso de ejercicio físico (FRAIOLI y col.,1980), por cambios de temperatura e inmovilización (BLECHA y col.,1982), o por

hipoglucemia experimental insulín-inducida (NAKAO y col.,1979), o incluso creando situaciones de estrés psicológico en animales normales (PITKIN, 1965) o expuestos a bajas dosis de rayos X (SATO y col.,1984).

Una idea de la variabilidad de modelos experimentales para crear situaciones de estrés, queda reflejada en la Tabla IV, donde se resumen distintos procedimientos que van desde simples prohibiciones y condicionamientos psicológicos diversos hasta producir daños físicos en distintas especies animales.

Un caso particular de estrés es el que se logra en un estado de morfínismo al producirse un síndrome de abstinencia por administración de un antagonista (MAGGIOLO y HUIDOBRO, 1961). Según TURNER (1965) son muchos los signos y síntomas que pueden observarse en la fisiología normal del ratón morfíno-dependiente, pero para sistematizar su intensidad, quizá sea lo más adecuado cuantificar la respuesta durante el periodo de hipermotilidad, particularmente en lo relativo al número y categoría de saltos en el síndrome de abstinencia, como la mejor medida cuantitativa de la adicción opiácea en la rata (BLASIG y col.,1973) y el ratón (HO y col.,1972), por existir una relación proporcional entre el número de saltos y el establecimiento del síndrome de abstinencia en función del grado de dependencia (MARSHAL y GRAHAME-SMITH, 1971). El desarrollo de la dependencia, en función de la dosis y el tiempo, puede controlarse además de por ciertos signos biológicos como el signo de STRAUB, actitud general, etc., por la pérdida de peso (LEZA y col.,1983) o por el índice de analgesia (WOOLFF y Mc DONALD, 1944). En resumen, cabe decir que son muy diversos los modelos a utilizar, tanto por la especie que se somete a morfíno-dependencia como por la modalidad de administración del fármaco; y de ello existen varios estudios de revisión en trabajos de tesis realizados anteriormente en el Departamento de Farmacología (NAVARRO, 1985; LIZASOAIN, 1986; PORTOLES, 1990), lo que justifica que no demos más extensión a esta particularidad del tema.

TABLA IV.- Diversidad en los modelos experimentales para producir situaciones de estrés. Se señalan los autores, y las principales alteraciones encontradas.

MODELOS DE ESTRES	ESPECIE ANIMAL	ALTERACIONES INMUNOLOGICAS	AUTORES
Tratamientos térmicos a bajas temperaturas (0°C a 5°C)	Ratones	Aumento o disminución de hipersensibilidad retardada (SRBC) y de contacto (a DNFB) según condiciones experimentales	Blecha y col. (1982)
	Pollos	Aumentan o disminuyen infecciones según agente patógeno	Regnier y Kelley (1981)
	Terneros	Disminución en hipersensibilidad retardada, de contacto e intradermorreacción a PHA	Kelley y col. (1982)
Tratamientos térmicos por calor sesiones repetidas de 15 a 35°	Ratones	Aumentos de hipersensibilidad retardada a SRBC y de contacto a DNFB	Blecha y col. (1982)
	Pollos	Aumenta o disminuye infecciones según patógenos	Regnier y Kelley (1981)
	Terneros	Disminución de hipersensibilidad (DTH, SC, PHA)	Kelley y col. (1982)

* Continúa

Por Calor 37°/60 min. y PBS i.v.	Ratones	Disminuye DTH a cloronitrobenceno	Pitkin (1965)
Por Calor. Quemaduras	Ratones	Deprime respuestas de inmunidad celular	Munster y col. (1973)
Privación de agua. (Beber 30'/día en 5 semanas)	Ratones	Aumento de mitogénesis PHA-inducida en esplenocitos, no en linfocitos periféricos	Jessop y col. (1984)
Electroshock en cola de 2" cada 1'	Ratas normales y sin adrenal	Supresión de blastogénesis PHA, proporcional a intensidad de shock	Keller y col (1983)
Electroshock en extremidad por placa eléctrica	Ratas	Suprime blastogénesis ConA y PHA-inducidas	Laudenslager (1983)
Ruido de 100db/día de 5" cada 1-3h noche	Ratones	Suprime mitogénesis en esplenocitos	Monjan (1977) Folch (1974)
Aceleración	Ratones	Disminuye respuesta a PFC anti-SRBC	Gisler (1974)
Aislamiento 5 semanas	Ratones	Aumento de blastogénesis PHA-inducida periférica, no esplenocitos	Jessop y col. (1984)
Separación afectiva	Monos (Madre -hijo)	Disminuye mitogénesis en sangre periférica	Laundenslager (1982)
	(Pareja)	Misma depresión	Reite y col. (1981)

Hacinamiento	Ratas	Depresión de la respuesta celular	Joasoo y McKenzie (1976)
Inmovilización forzada	Ratones	Disminución DTH frente a SRBC y aumenta sensibilidad a DNFB	Blecha y col (1982, a)
Prohibiciones y condicionamientos psicológicos adversos	Ratones	Depresión de respuestas celulares	Ramussen (1969)

1.6.2.- En relación con los cuadros de anafilaxia.

El acontecimiento inicial de todo cuadro anafiláctico depende de la reacción de un antígeno o alérgeno con anticuerpos homocitotrópicos específicos (IgE, IgG), que existen ligados a receptores de membrana en mastocitos tisulares y basófilos, desencadenando la síntesis y liberación de mediadores. Dichos mediadores afectan a la permeabilidad capilar, permitiendo el influjo de proteínas sanguíneas en tejidos adyacentes, con el consiguiente desequilibrio osmótico y edema tisular. En la piel, esto se manifiesta por la formación de un habón urticarial y eritema; además se producen contracciones en las fibras musculares lisas y secreción de glándulas endocrinas. En estos casos la reacción se produce en segundos y tiene una duración relativamente limitada.

En otros casos, sobre todo en los de anafilaxia pasiva de tipo sistémico, pueden también originarse una serie de reacciones secundarias con participación de otros tipos celulares (eosinófilos, neutrófilos, plaquetas) que liberan factores quimiotácticos de eosinófilos (FQE-A), para atracción de neutrófilos (FQN), para activación de plaquetas (FAP) o con una potencial actividad en el proceso inflamatorio (tromboxanos, leucotrienos). Más recientemente se ha comprobado la sensibilización pasiva de monocitos mediante su incubación con suero de pacientes alérgicos, lo que llega a producir fenómenos citotóxicos (WECK, 1983).

También es posible encontrar reacciones producidas por inmunocomplejos que conducen a una lesión tisular, pero para que tenga consecuencias patológicas han de cumplirse una serie de condicionantes que dependen del tamaño, estructura y solubilidad o eliminación del complejo. La deposición tisular de estos complejos requiere una afinidad peculiar para el tejido orgánico, incrementos de permeabilidad capilar y participación sensibilizante de algunos fragmentos del complemento (C3a, C5a) (WECK, 1983).

Las reacciones por inmunocomplejos frente a fármacos, como es el caso del fenómeno de Arthus, son mas bien raras y en ellas hay modalidades de respuesta que recuerdan a la enfermedad del suero. La fisiopatología de estos cuadros de hipersensibilización por inmunocomplejos se establece en varios estadios: a) formación del inmunocomplejo con exceso de antígeno; b) deposición tisular del inmunocomplejo; c) activación del complemento; d) atracción de polimorfonucleares neutrófilos; y e) liberación de enzimas lisosómicos proteolíticos y de proteínas catiónicas inflamatorias. La importancia del incremento de permeabilidad para la deposición de los inmunocomplejos se ha puesto de manifiesto mediante el empleo de fármacos anti-histamínicos y anti-serotoninicos (KNIKER y col.,1971).

Existen diversos modelos de interacción anafiláctica en los que se puede comprobar la respuesta total o evaluar el nivel de los distintos mediadores que intervienen (BROCKLEHURST, 1960). Según WEISER y col. (1941), los ratones son relativamente resistentes a sufrir un shock anafilático. Teniendo esto en cuenta, la anafilaxia cutánea pasiva (PCA) ha sido la más ampliamente utilizada para reconocer cuantitativamente anticuerpos homocitotrópicos (OVARY, 1958), mientras que para reacciones cualitativas de este tipo de reacción se requieren procedimientos más especiales (MITSUYA y col.,1981). Entre los primeros métodos descritos, para estudios de broncoconstricción alérgica, fué el de AUER y LEWIS (1910) y algo más tarde el de ALEXANDER y col. (1925), en el que también se acudía a producir el cuadro anafilático en cobayas sensibilizados mediante inhalación del antígeno específico, pero en ninguno de los casos se realizaban estudios cuantitativos ni se llegó a controlar la liberación de mediadores en la anafilaxis bronquial bajo estas condiciones experimentales. La naturaleza y actividad de dichos mediadores han sido estudiadas posteriormente y, en particular, para la histamina (BARTOSCH y col.,1932) y distintos metabolitos del ácido araquidónico (BROCKLENHURST, 1960; PIPER y VANE, 1969; HAMBERG y col.,1976; ANDERSON y col.,1983). Más recientemente se han

propuesto diferentes modelos de hipersensibilización pulmonar, en ratones, que pueden dar lugar a una reacción anafiláctica por inhalación. Entre ellos, mencionaremos en primer lugar el de McKASKILL y col. (1982), en el que por vía nasal se produce una hipersensibilización con polen de gramíneas y después, por la misma ruta, se desencadena la reacción anafiláctica con el mismo alérgeno. Sin embargo, como en estos casos se originan inflamaciones inmunológicamente inespecíficas, aunque localizadas en vías respiratorias altas, el modelo no es recomendable para estudios farmacológicos por la propia complejidad del material biológico.

Estas dificultades han conducido a otros investigadores que tenían idéntico propósito de sensibilizar animales a nivel bronquial, a la utilización de aerosoles de ovoalbúmina como agente sensibilizante, en cuadros de hipersensibilización pulmonar experimental en cobayas, (HERXHEIMER, 1952) y en ratas (SHORTLAN y SHORE, 1974; PIECHUTA y col., 1979), puesto que esta molécula no produce inflamaciones inespecíficas. También con este modelo se han realizado estudios de regulación de respuestas de IgE en ratones, con el propósito de extrapolar resultados para un mejor conocimiento de los mecanismos de sensibilización alérgica en humanos (HOLT y col., 1981; IMAI y col., 1983). Un interesante modelo de anafilaxia experimental en ratón, por hipersensibilización intranasal con ovoalbúmina, ha sido propuesto por McCASKILL y col. (1984) para estudiar los mecanismos inmunológicos de anafilaxia. Siguiendo este método, en ratones convenientemente sensibilizados con dos inyecciones de ovoalbúmina asociada a vacuna anti-pertusis como coadyuvante, se desencadena un shock anafiláctico no fatal cuando se administra ovoalbúmina por ruta intranasal, apareciendo el máximo de reacción a los 30 minutos de administrar el desencadenante proteínico. Los signos de máxima gravedad del shock coinciden con incrementos del valor hematocrito y con aumentos en los niveles de IgE e IgG. Este modelo no conlleva participación del Complemento, ya que cuando se produce una depleción previa del complemento sérico, mediante administración de veneno

de cobra, no se modifica la respuesta anafiláctica en los ratones. También, más recientemente, PAYNE y DE NUCCI (1987) han desarrollado dos métodos "*in vitro*" e "*in vivo*", en los que ocasionan un cuadro de anafilaxia bronquial por aerosoles de ovoalbúmina en cobayas anestesiados y en pulmones aislados de cobaya. La broncoconstricción alérgica es aliviada con antagonistas H₁; también, mediante la técnica "*in vitro*", estudian la liberación de mediadores anafilácticos subsiguientes al desencadenamiento de la agresión.

En cuanto a otros modelos de anafilaxia pasiva de carácter sistémico, hemos encontrado uno desarrollado en ratas por MOTA y WONG (1969) y que se funda en una reacción clásica de anafilaxia cutánea pasiva; sin embargo, nos parece más interesante destacar una técnica propuesta por KANETA y col. (1984) en ratones, que se funda en producir una sensibilización pasiva en la almohadilla plantar del ratón con anticuerpos homólogos (25 µl) y después, desencadenar la respuesta anafiláctica mediante inyección intravenosa del antígeno (100 µl), transcurrido un adecuado tiempo de sensibilización de 2 horas al menos. El engrosamiento producido en la pata del animal, como consecuencia de una reacción anafiláctica, puede ser registrado cuantitativamente mediante un calibrador o de un modo análogo al método de la carragenina usado para estudios de antiinflamatorios (WINTER y col, 1963). Como antígeno utilizan albúmina de suero bovino (BSA) y como fuente de anticuerpos homocitotrópicos, emplean líquido ascítico conteniendo anticuerpos anti-BSA procedente de ratones que han sido inmunizados por vía intraperitoneal con BSA más coadyuvante de Freund completo; para ello utilizan el método de TUNG y col. (1976), en el que se modifica un procedimiento de MUÑOZ (1957). En todos los casos, el máximo de reacción se alcanzó a los 15 minutos de administrar el antígeno (BSA) en los animales que habían sido sensibilizados dos horas antes con el líquido ascítico conteniendo los anticuerpos anti-BSA de ratón.

Con propósitos de evaluación farmacológica de antagonistas de acetil-FAP, VILAIN y col. (1986) desencadenan un shock por anafilaxia pasiva en cobayas inyectando por vía intraperitoneal 1 ml de suero anti-ovoalbúmina para después de 10 a 14 días inyectar por vía endovenosa el antígeno (ovoalbúmina), lo que produce un cuadro asmático con liberación de histamina en distintos órganos. También con suero anti-ovoalbúmina, pero mediante sensibilización intradérmica, GOOSE y BLAIR (1969) estudiaron el efecto de reagentes termosensibles, en ratas, y su inhibición específica por cromoglicato sódico; el fenómeno desencadenante del cuadro anafiláctico se controla por el tamaño de las zonas dérmicas donde se produce la reacción y que se hacen visibles por azul de Evans.

En ocasiones, se utiliza una reacción homóloga de anafilaxis cutánea adoptiva (ACAHo), como la preconizada por KIND y ALLAWAY (1983), para detectar la formación de IgG a nivel celular y determinar el efecto de distintos fármacos sobre la formación de estos anticuerpos sensibilizantes. El método es una variante del que da origen a un fenómeno de anafilaxis cutánea adoptiva heteróloga (ACAH), que se produce sensibilizando ratones con esplenocitos de otros que han recibido inyecciones repetidas de globulina de conejo en forma de anticuerpos anti-timocito de ratón (KIND y MACEDO-SOBRINHO, 1973).

Mediante este procedimiento se puede estudiar la producción localizada de IgE. Estos modelos son semejantes al ya clásico de anafilaxis cutánea pasiva (PCA) propuesto por MOTA y WONG (1969), excepto que en lugar de inyectar suero en la piel, se inyectan células de un ratón convenientemente inmunizado (esplenocitos, linfocitos, placas de Peyer, etc.). Reacciones heterólogas adoptivas se han utilizado para comprobar la inducción de tolerancia (LEE y SEHON, 1975; CHIORAZZI y col., 1976), para la localización de los sitios específicos de formación de IgE (THOMAS y col., 1980) y para modular la producción de IgE por distintos fármacos.

Otro de los modelos de anafilaxia pasiva heteróloga, de carácter generalizado, se basa en el desencadenamiento de un fenómeno anafiláctico mediante la formación "*in vivo*"

de inmunocomplejos anti-endotoxina (PORTOLES y col.,1984). En opinión de algunos autores los modelos experimentales con inducción de inmunocomplejos son fundamentales para estudiar mecanismos patogénicos de lesiones vasculares (DIXON y col.,1961; KNIKER y COCHRANE, 1968) y permiten una mejor interpretación y control clínico de distintas enfermedades (COCKRANE y KÖFFLER, 1973; WILLIAMS, 1980). En este modelo se inyecta intravenosamente una dosis sensibilizante de antisuero de conejo anti-Brucella y al cabo de 3 horas, al menos, se inyecta por la misma vía una solución del antígeno endotóxico, que es el desencadenante del shock; éste se manifiesta, a tiempos variables, en forma de erizamiento piloso, disnea, vasodilatación con el consiguiente descenso de presión sanguínea, cianosis, colapso vascular y muerte. Por los tiempos de muerte de cada ratón, se calcula el tiempo medio de muerte (TL_{50}) dentro de cada grupo, utilizando un método nomográfico, y así se puede valorar el posible efecto protector de distintos fármacos.

II. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El primer objetivo del presente trabajo consiste en realizar una revisión de la literatura, intentando resumir el estado actual del conocimiento en el campo de las interacciones neuroinmunitarias. Una vez desarrollado éste, comenzamos una serie de experimentos con el fin de estudiar con detalle los cambios producidos en el sistema inmune en situaciones de estrés, para posteriormente ensayar el uso de algunos fármacos que puedan modular esta interacción, y a la vez aportar más datos sobre el mecanismo íntimo de esta comunicación.

Empezamos por seleccionar varios modelos productores de estrés experimental en ratones, que intentan reproducir situaciones en las que existe una incapacidad de adaptación al medioambiente, originándose una situación de alarma y una alteración del estado anímico. Seleccionamos, entre los que nos parecieron menos cruentos, aquellos que pueden provocar una situación de estrés repetible durante varios días, en condiciones homogéneas, sin interferir mediante otros mecanismos en nuestras determinaciones y, particularmente, aquellos en los que se ha descrito alguna alteración inmunitaria (Tabla IV).

Los modelos que vamos a utilizar son los siguientes: dos con un estímulo psicosocial, como son el **aislamiento** del roedor, o la disminución de espacio vital con el consiguiente **hacinamiento** de los animales; otro en el que se origina un estrés de tipo físico, causado por la **Inmovilización** del animal en un tiempo y condiciones determinadas; y por último, un estímulo farmacológico como el producido por la **morfino-dependencia**. En todos los casos utilizamos los niveles de corticosterona, determinados en plasma de ratón, como marcador bioquímico del nivel de estrés alcanzado.

El modelo de morfino-dependencia presenta unas especiales características, ya que se trata de un estímulo que puede actuar directamente a nivel de los receptores opioides descritos en los linfocitos, o a nivel del SNC; y permite la instauración de un cuadro de estrés modulable farmacológicamente por medio de la producción de un síndrome de

abstinencia. Se ha seleccionado este modelo con el fin de aportar datos que contribuyan a aclarar la controversia existente en la literatura, ya que para algunos autores los efectos observados en situaciones de dependencia se deben a la acción directa de la morfina sobre células inmunocompetentes, mientras que para otros, los efectos observados son consecuencia de la situación de estrés originada.

También sobre estos modelos experimentales, nos proponemos estudiar las alteraciones provocadas en la respuesta inmune. Para ello utilizaremos células obtenidas a partir del bazo del ratón, determinando diversos parámetros de actividad inmunitaria a nivel celular para estudiar los diferentes grupos celulares implicados en la respuesta inmune. Así, estudiaremos: la proliferación de linfocitos T y B, inducida por mitógenos o antisueros específicos; la capacidad productora de interleukina-2; y la actividad citotóxica de células NK.

Seguidamente, estudiaremos el funcionamiento del sistema inmune "in vivo", provocando cuadros de anafilaxia experimental. Para ello realizaremos una puesta a punto de modelos de anafilaxia pasiva a nivel sistémico y cutáneo. Con el propósito de observar diferencias fisiopatológicas, ensayaremos varios modelos, utilizando diferentes antígenos y diferentes proporciones Ag/Ac; así como diferentes razas de ratones, y varias secuencias experimentales. Pensamos que estudiando la respuesta inmune en el animal completo en situaciones de estrés, podemos tener una mejor idea de la interrelación entre los sistemas inmunológico y neuroendocrino; así como sobre el funcionamiento de respuestas anafilácticas en situaciones de estrés.

En lo referente al estudio farmacológico, decidimos seleccionar varios grupos de fármacos con intención, por un lado, de intentar modular la respuesta inmunológica en situaciones de estrés; y por otro, conseguir más datos que nos permitan avanzar en la comprensión de los mecanismos de comunicación neuro-inmunológica. De este modo, comenzamos empleando un extracto vegetal de *Eleutherococcus senticosus* que presenta,

según estudios previos, cierto efecto "adaptógeno" debido a los eleuteróxido-glucósidos que entran en su composición.

Por otra parte, según se cita en el capítulo precedente, se ha comprobado que la influencia del cerebro sobre el sistema inmune, está sometida a lateralización hemisférica, y de ahí nuestro interés en ensayar el efecto del dietil-ditiocarbamato (DTC), para comprobar si esta lateralización influye en las variaciones de la respuesta inmune inducidas por el estrés.

Por último, empleamos una serie de fármacos que intervienen en los sistemas serotoninérgico e histaminérgico. Se ha visto que la histamina, inyectada en cerebro de ratón, es capaz de modificar el comportamiento, pero no se ha estudiado apropiadamente cual es el efecto de la histamina liberada en situaciones de estrés sobre la respuesta inmune. Además, la existencia de interacciones entre péptidos opioides y liberación de histamina por mastocitos, que tanta importancia tienen en las reacciones de hipersensibilización, justifica el empleo de anti-histamínicos, y anti-serotoninicos en el modelo de morfinodependencia. Como es sabido, estos sistemas se encuentran implicados a nivel periférico en la respuesta inmunológica (especialmente en reacciones anafilácticas), pero también pueden jugar cierto papel a nivel central, ya que ambos funcionan como sistemas de neurotransmisión cerebral, y por ello seleccionamos fármacos con mayor o menor selectividad periférica.

En todos los casos de modulación farmacológica, se valorará su efecto sobre el nivel de estrés alcanzado en cada modelo, y se estudiarán las variaciones de la respuesta inmunológica (transformación linfoblástica, síntesis de IL-2, y variaciones de citotoxicidad natural), así como las alteraciones en los cuadros de anafilaxia, utilizando como parámetros la mortalidad y el TL_{50} (en la anafilaxia sistémica) y el tamaño de lesión dérmica (en la anafilaxia cutánea). Finalmente, para completar el estudio de estos cuadros, emplearemos

fármacos con efecto sobre el Complemento, que tanta influencia tiene sobre la patogénia por inmunocomplejos.

Esperamos que los resultados obtenidos aporten nuevos datos al conocimiento de la interacción neuroinmune en situaciones de alarma, producidas por la incapacidad de adaptación a cambios bruscos en las condiciones medioambientales, y a su posible modulación farmacológica.

En la siguiente figura, se muestra un resumen del desarrollo experimental de este trabajo.

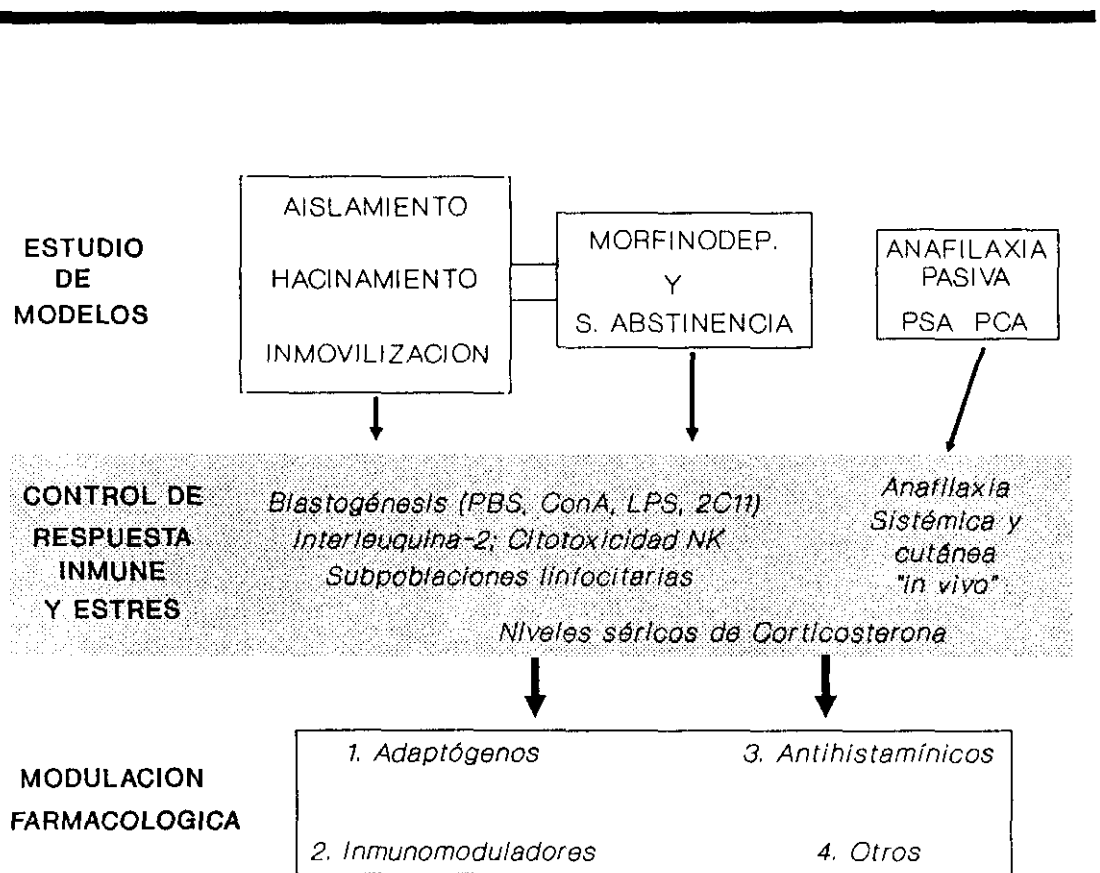


Fig. 9.-Representación esquemática del desarrollo experimental de este trabajo, y de sus objetivos.

III. MATERIAL Y METODOS.

III.1.- MATERIALES Y MEDIOS.

III.1.1.-Animales

La mayor parte de los experimentos se han realizado sobre ratones BALB/c (Interfauna Iberica S.A.), de 8-12 semanas. En ocasiones, estudiamos comparativamente las respuestas entre animales de 8 y 36 semanas de edad respectivamente. En ensayos previos sobre variaciones de respuestas condicionadas por la estirpe murina empleamos otras razas de ratones consanguíneos, cuyas características genéticas también son perfectamente conocidas, como los C3H y C57Bl/6 (Centro de Investigaciones Biológicas y Centro de Biología Molecular) (Tabla V). Las comparaciones entre BALB/c y C3H nos han permitido controlar más específicamente las respuestas frente a las distintas endotoxinas utilizadas como antígenos.

Tabla V. Características genéticas de los ratones utilizados, en relación con el sistema principal de histocompatibilidad (H-2). Región I (genes Ir), y Región S que codifica al C4.

Estirpes murinas	K	Región-I				Región-S			Haplotipo H-2
		A	J	E	D	Ss	-	Slp	
C57Bl/6	b	b	b	b	b	Ssh	-	Slpo	b
C3H	k	k	k	k	k	Ssl	-	Slpo	k
BALB/c	d	d	d	d	d	Ssh	-	Slpa	d

Para la obtención de sueros sensibilizantes, se utilizaron: a) conejos blancos de Nueva Zelanda, que pesaban por término medio unos 4 kilos en el momento de iniciar la

inmunización; y b) ratones Swiss Webster de 10 semanas de edad y de unos 28-30 gramos de peso.

Los animales fueron mantenidos en jaulas de plástico, con agua y comida "ad libitum", a una temperatura ambiente de 20-22° C, y con fotoperiodos día:noche de 12:12 horas.

III.1.2.-Cultivos celulares

Los ensayos inmunofarmacológicos "ex vivo" se realizaron sobre linfocitos esplénicos procedentes de ratones BALB/c obtenidos según técnica previamente descrita (ROJO y col. 1983a).

También se utilizaron cultivos de células CTLL-2 para determinaciones de interleuquina-2 y células YAC-1 para estudios de citotoxicidad NK.

III.1.3.-Antígenos

Como moléculas inmunizantes empleamos, por una parte, varias endotoxinas (EDTX), y por otra, albúmina bovina (BSA). Entre las primeras, hemos seleccionado la fracción endotóxica F5 aislada a partir de la estirpe *Brucella abortus* 2308, obtenida por el método de WESTPHAL (BAKER y WILSON, 1965) y a partir de cultivos de 48 horas a 37° C con agitación, sobre medio líquido de Tripticasa-soja (BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, Md.). Para ensayos de sensibilización cruzada, se utilizaron otras moléculas de endotoxinas bacterianas procedentes de *Yersinia enterocolítica* (serotipo 8), y lipopolisacárido de *Escherichia coli* (055:B5, Difco).

En el otro tipo de experimentos, generalmente para reacciones PCA, se utilizó como antígeno albúmina bovina (BSA) cristalizada y liofilizada (Sigma).

III.1.4.-Anticuerpos sensibilizantes

Según la respuesta anafiláctica estudiada se usaron como anticuerpos sensibilizantes: a) Suero de conejo hiperimmune anti-B.abortus 16 M (PORTOLES y col, 1984); y b) Suero de ratones convenientemente inmunizados con BSA, según la técnica de MOTA y PEIXOTO (1966).

III.1.5.-Anticuerpos para citofluorometría

Para este estudio, se utilizaron distintos anticuerpos monoclonales, facilitados por el Dr. Rojo del C.I.B, y cuyas características se indican a continuación: Ig G de hamster anti-CD3 ϵ de ratón (145-2C11); Ig G ϵ de rata anti-CD3 ϵ de ratón (YCD3-1); IgG2b de rata anti-CD4 de ratón (GK1.5); IgG2a de rata anti-CD8 (53-6.72); e IgG de rata anti-Thy-1 de ratón (Y-19). Todos ellos fueron purificados por cromatografía de afinidad con proteína A, a partir de sobrenadantes de cultivo de hibridomas precipitados en sulfato amónico.

III.1.6.-Medios de cultivo y soluciones

Además del medio de cultivo Tripticasa-soja (BBL) antes citado, se utilizaron placas de Bacto peptona-agar (Difco) cuando se trataba de ensayar la esterilidad de los sueros y soluciones endotóxicas a emplear.

La solución salina tamponada (PBS), fué preparada a partir de dos soluciones conteniendo: la Sol.A, ClNa (8 g.) y ClK (0.2 g.) en 400 ml de agua bidestilada; y la Sol.B, con PO₄H₂Na₂.12 H₂O (2,8 g.) y PO₄H₂K (0.2 g.) en otros 400 ml de agua bidestilada. Se mezclan ambas soluciones, se completan hasta el volumen de un litro con agua bidestilada y se esteriliza en autoclave después de comprobar que su pH final es 7,2. En los casos requeridos, esta solución PBS, fué suplementada con EDTA al 0.02%

Tambien se utilizó **solución salina tamponada de Mishell y Dulton (MBSS)** para el manejo de los cultivos celulares. Su composición es de 8 g de ClNa; 0,2 g de Cl₂Mg.6H₂O;

0.2 g de $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.06 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$; 0,461 g de $\text{PO}_4\text{HNa}_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0.186 g de $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.4 g de ClK; 1 g de D-Glucosa; 0.01 g de rojo fenol; gentamicina (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$); agua de grado reactivo hasta un litro.

Como **medio de cultivo base (sin suero) para células de mamífero**, se utilizó RPMI-1640 de Flow, con 2 g de CO_3HNa y 2mM de L-glutamina, más gentamicina (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ocasionalmente este medio era suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS) previamente inactivado a 56° durante 30 min.

En algunas ocasiones se utilizó **medio RPMI-1640 enriquecido** (medio K) con L-glutamina (2 mM), HEPES (10 mM), 2-mercaptoetanol (2- β -ME; 70 μM), aminoácidos no esenciales y gentamicina (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los aminoácidos no esenciales y la glutamina fueron añadidos a partir de una solución de Gibco concentrada (100x). Este medio fue suplementado con 5-10% de suero fetal bovino (FCS) inactivado.

Todas estas soluciones fueron esterilizadas por filtración a través de filtro Millipore 0,22 μm de poro.

III.1.7.-Mitógenos y reactivos celulares

Empleamos dos tipos de mitógenos: a) Lipopolisacárido (LPS) de Escherichia coli (Bactopolysaccharide W.E. Coli: B5 Difco), y b) Concanavalina A (Con A), lecitina obtenida a partir de Cannavalina eusiformis por Calbiochem (Grado A).

Los mitógenos fueron disueltos en PBS a las concentraciones adecuadas, y esterilizados por calentamiento en baño de agua hasta 100° C durante 60 min (LPS), o por filtración (Con A). Después se mantuvieron congelados a -20° C hasta su utilización.

Se utilizó Timidina tritiada (metil-3H-timidina, 3H-TdR), de actividad específica 25 Ci/mmol (102 mCi/mg), a una concentración de 1mCi/ml. La timidina diluida a 1/10 fué utilizada para dar pulsos de 0.5 μCi ó 1 $\mu\text{Ci}/\text{cultivo}$. Este producto fue adquirido a The Radiochemical Center, Amershaw.

III.1.8.- Fármacos

Se han utilizado varios fármacos, que podemos subdividir en cuatro grupos:

1) Como moduladores de la situación de estrés, se emplearon extractos saponínicos del *Eleuterococcus senticosus* (Lab Normon).

2) Como modificadores de la interacción neuroinmune, se ha utilizado el **Dietil-dithiocarbamato** (DTC) (Lab Rhône Poulenc); sustancia inmunomoduladora, que presenta efectos dependientes del sistema nervioso central a nivel del córtex.

3) Se emplearon también fármacos con acción sobre los sistemas histaminérgico y serotoninérgico que, según los casos, pueden actuar como reguladores del brazo efector de la respuesta inmune, o de la interacción neuroendocrina a nivel central. Entre ellos destacan: **Clorfeniramina** (Cf), **Tripelenamina** (Tp), **Cimetidina** (Ci), **Ciproheptadina** (Cy), y como estabilizador de membrana, el **Cromoglicato** (Cr).

4/ Como moduladores de la respuesta inflamatoria se utilizaron: antiagregantes plaquetarios como **Ticlopidina** (Tc), inhibidores de tromboxano como el **Imidazol-alfa-cetoglutarato** (α -IC), anti-inflamatorios inhibidores de prostaglandinas como la **Indometacina** (Id), anti-aterogénicos como el **Clofibrato** (Cl) e inhibidores del complemento como la **Suramina** (Su) y **Acido flufenámico** (Af).

Para el modelo de dependencia se empleó **Morfina base** (Mfn) (Unión Química Farmacéutica S.A.E., del Centro Nacional de Estupefacientes y Psicotropos) para preparar los "pellets" de liberación retardada según técnica modificada de GIBSON y TINGSTAD (1970). La composición de los "pellets" es: 75 mg de morfina, 75 mg de celulosa microcristalina (Avicel), 1.5 mg de estearato magnésico, y 0.75 mg de dióxido de silicón; obteniéndose comprimidos de 7 x 3 mm. En ocasiones se emplearon "pellets" con lactosa en lugar de morfina para el grupo control. La **Naloxona** (Nx) se utilizó como antagonista opiáceo a dosis de 1 mg/Kg en inyección subcutánea, para desencadenar un síndrome de abstinencia.

III.2.- TECNICAS Y MODELOS EXPERIMENTALES.

III.2.1.- Modelos experimentales de estrés.

Para el modelo de **aislamiento (AIS)**, se emplearon jaulas de plástico, 30x30x25 (PANLAB) con un solo animal por jaula, y se aíslan visual y acústicamente entre sí por paneles de porexpan, en habitación independiente para evitar interferencias. Los animales tenían libre acceso al agua y la comida, y fotoperiodo luz/oscuridad 12:12. En los ensayos de **hacinamiento (HAC)**, se emplearon las mismas jaulas colocando 24 animales en cada una de ellas, con las condiciones habituales de agua, comida y fotoperiodo. Para el modelo de **inmovilización (INM)** se emplearon bolsas flexibles realizadas especialmente con malla de hilo metálico sin nudos, trama dos mm., modificación personal del modelo propuesto por BLECHA y col. (1982), en las que una vez introducido el roedor, se reducía el espacio con pinzas fijas hasta su inmovilización. Este sistema permitió asegurar una inmovilización del animal, independientemente de su tamaño, sin producir lesiones físicas, manteniendo la transpiración, y con una resistencia aceptable a las mordeduras del animal.

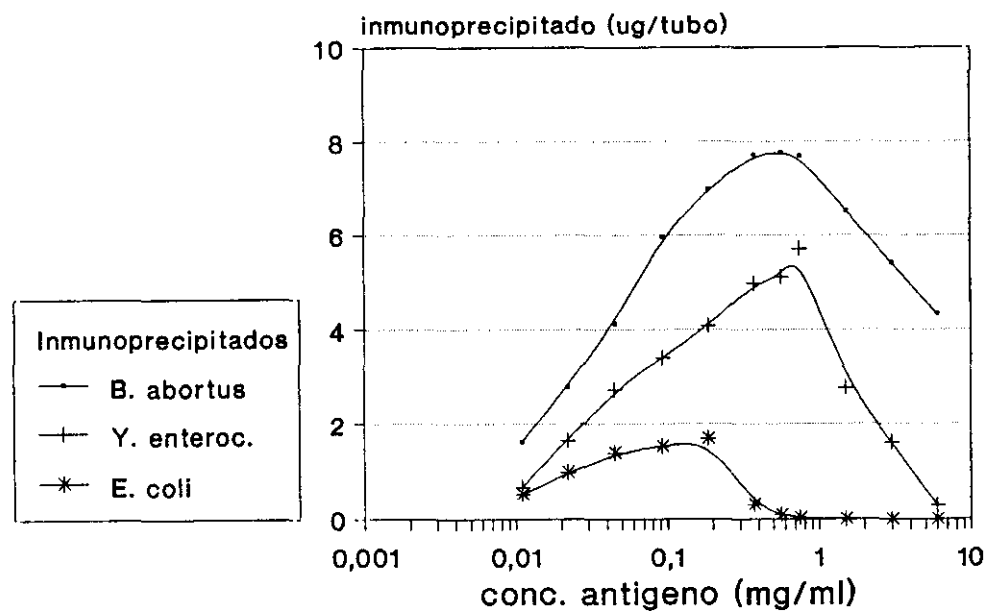
Para el modelo de **morfino-dependencia (MFN)**, se emplearon "*pellet*" de morfina según fórmula modificada de GIBSON y TINGSTAD (1970), con la composición indicada previamente. Para los grupos control, se emplearon "*pellet*" que contenían lactosa. La técnica de implantación subcutánea es sencilla y rápida, y no requiere anestesia. Se coloca al animal sobre una rejilla, manteniendo las normas de asepsia, y tras depilar la zona, se realiza un corte en la piel, se libera el espacio subcutáneo con unas pinzas, y se introduce el "*pellet*", procediendo al cierre de la herida con un punto de sutura.

III.2.2.-Obtención de sueros anti-Brucella.

Se obtuvieron sueros de conejo hiperinmune tras inmunizar los animales por vía i.v. con una suspensión de 2×10^6 células vivas de *B. abortus* 16 M en 0,5 ml. de PBS a pH 7,2. Al cabo de un mes se sangraron los conejos y, después de la coagulación de la sangre, se separó el suero según es habitual en el laboratorio.

III.2.3.-Determinaciones de Inmunoprecipitación cuantitativa

Para medir la interacción específica antígeno-anticuerpo y así tener una idea del tipo de inmunocomplejo que se puede producir, se ensayaron curvas de precipitación añadiendo cantidades crecientes de antígeno a volúmenes constantes de antisuero según



con 0,25 ml de suero anti-Brucella

Fig. 10.-Curva de inmunoprecipitación para tres antígenos diferentes, en función de su concentración en el medio.

la técnica recomendada por KABAT (1968) (Fig. 10).

III.2.4.-Determinación de proteínas

En los complejos antígeno-anticuerpo, previamente disueltos en NaOH 1 N, así como en los sueros hiperinmunes y en las endotoxinas, se determinaron las proteínas por la técnica de LOWRY y col. (1951).

III.2.5.-Determinación de DL₅₀ para moléculas endotóxicas.

Para estos ensayos, se prepararon una serie de diluciones crecientes de las endotoxinas correspondientes en PBS. Cada una de estas diluciones se inyectó por vía i.p. o i.v. (0,2 ml /ratón). Los animales se mantuvieron en observación durante 8 días, registrando las muertes que se produjeran en cada grupo durante todo este tiempo de observación. Los datos obtenidos se procesaron utilizando un programa (DELETHAL), especialmente diseñado para estudios de patogenicidad y cálculo de los valores de DL₅₀.

III.2.6.-Anafilaxia sistémica pasiva (PSA) y determinación del TL₅₀

Para producir cuadros sistémicos de anafilaxia pasiva por inmunocomplejos, se indujo la hipersensibilización del ratón por medio de la administración i.v. (en el plexo retroorbital) de 0,2 ml. de antisuero específico (dosis sensibilizante) y después, por la misma vía, se inyectó 0,2 ml. de la solución endotóxica, previamente disuelta en PBS a las concentraciones que se indican en el capítulo de resultados. Normalmente se estableció un intervalo mínimo de tres horas entre el momento de la sensibilización por el suero y la inyección antigénica desencadenante del shock, según se ha indicado previamente (PORTOLES y col. 1984), igual que para la determinación del tiempo medio de muerte (TL₅₀).

III.2.7.-Anafilaxis cutánea pasiva (PCA)

Después de algunos ensayos previos en los que se tuvieron en cuenta los resultados de PROUVOST-DANON y col. (1967) se ensayaron dos métodos de sensibilización pasiva: a) procurando una sensibilización de piel entera mediante una inyección intravenosa de los anticuerpos sensibilizantes, es decir; lo que constituye la propia reacción PCA de OVARY (1958); y b) por sensibilización de áreas localizadas de la piel inyectando intradérmicamente los anticuerpos para dar lugar a lo que algunos autores prefieren llamar reacción cutánea pasiva reversa (PCR) o reacción revertida de anafilaxia pasiva, que más propiamente pudiera considerarse como un fenómeno de Arthus.

También se provocó una sensibilización general mediante inyección intravenosa del anticuerpo (0.2 ml. de suero por vía retroorbital) para, 48 horas más tarde, inyectar el antígeno por vía intradérmica (0.5 µg de albúmina o 0.25 µg de endotoxina en 0,05ml. de PBS). De este modo se producen en el dorso de cada ratón unas lesiones intradérmicas en los lugares de administración del antígeno.

Cinco minutos antes de administrar el antígeno, se inyectó 0,1 ml. de azul de Evans al 0,5% en PBS para hacer visibles los aumentos de permeabilidad. Aproximadamente una hora más tarde, tiempo suficiente para producir una reacción visible de anafilaxia cutánea, sacrificamos al animal para determinar el área de las lesiones en la cara interna de la piel. La intensidad de la reacción se cuantificó calculando la media geométrica de los diámetros de las distintas lesiones y determinando, después, las variaciones del % de respuesta para los casos de estrés, o por el efecto de los tratamientos farmacológicos, mediante la fórmula:

$$\% = 100 - (\text{media grupo tratado}/\text{media grupo control}) \times 100.$$

III.2.8.-Ensayos de transformación linfoblástica

Se obtuvieron los bazos de los roedores en condiciones estériles, tras sacrificarlos por dislocación cervical. Los órganos extraídos se trituran en una rejilla de acero inoxidable, disgregándolos sobre una placa petri conteniendo MBSS frío. Así se prepara una suspensión que se sedimenta en un tubo mantenido en hielo durante 5 min. Se recogen las células sobrenadantes, y se lavan tres veces en MBSS frío con sucesivas centrifugaciones, resuspendiendo las células posteriormente en medio de cultivo. Finalmente se recuentan las células visibles con azul tripano al 0.25% y se ajusta la suspensión celular a la concentración deseada.

El cultivo de células se efectuó sobre placas microtiter de 96 pocillos a los que se añadían 200 μ l de la suspensión celular por pocillo (2.5×10^6 células/ml). Después se añadía el mitógeno correspondiente en volúmenes de 10 μ l y las soluciones de fármacos a la concentración deseada en 20 μ l. En todos los casos se establecieron controles sin mitógenos.

Los cultivos se mantuvieron 48 h en el incubador de CO₂ a 37° C, con atmósfera de 5% de CO₂ y humedad a saturación. Al cabo de este tiempo se añadió a cada pocillo un pulso de ³H-TdR (0.5 μ Ci/pocillo), y se vuelven a incubar las células otras 24 horas. Alternativamente se puede dar un pulso de 1 μ Ci durante las últimas 4 horas de esos tres días de cultivo.

Pasado el tiempo total de incubación, las células se recogieron sobre filtros de fibra de vidrio GF/A mediante cosechador automático para recogida de muestras múltiples. Los filtros con las células se transfieren a viales de vidrio para contador de centelleo líquido, se añaden 2 ml de líquido de centelleo, y se mide la radioactividad beta incorporada en un contador LKB. Las determinaciones se hicieron por triplicado, y los resultados se expresan en cada caso como c.p.m. de ³H-TdR incorporada. Dicha medida da una idea exacta de la síntesis de ADN producida durante la proliferación celular.

III.2.9.-Ensayos de proliferación celular en placa.

En ocasiones, particularmente en los experimentos de citometría de flujo (FACS), se determinaron las variaciones de respuesta linfoproliferativa sobre placas de microcultivo de 96 pocillos de fondo plano (Costar), y utilizando para la activación, no sólo los mitógenos a distintas concentraciones, sino también algunos anticuerpos monoespecíficos como el 2C11. Con este procedimiento se mide la actividad celular en función de la concentración de una enzima mitocondrial en el cultivo: la Succinato-deshidrogenasa, que refleja perfectamente el grado de viabilidad celular.

Se aplicó el método de MOSSMAN (1983), utilizando volúmenes finales de cultivo de 0,1 ml. (con 10^4 células por pocillo), y después de añadir los distintos elementos en las placas (PBS, mitógenos, o anticuerpos), se llevan a incubar con 5% de CO_2 y se mantienen a 37° durante 72 horas. Al cabo de este tiempo se mide la proliferación celular por reacción colorimétrica (MOSSMAN, 1983) con MTT como sustrato; para ello se añaden 20 μl . de la solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazolio (Sigma M2128) disuelto en PBS (2,5 mg/ml).

Al cabo de 4 horas a 37° se detiene la reacción, en la que se ha originado MTT-formazán de color azul, mediante la adición de isopropanol ácido (0,1 ml/cultivo de alcohol isopropílico + ClH 0,04N). El crecimiento celular se determina midiendo las variaciones colorimétricas en un espectrofotómetro lector de microplacas a 550 nm. y utilizando como referencia la lectura a 690 nm.

III.2.10.-Determinación de Interleuquina-2 (IL-2)

Para valorar la producción de IL-2 por esplenocitos estimulados por Con A, se utilizó el método de GILLIS y cols. (1978), determinando la capacidad de los sobrenadantes de linfocitos esplénicos murinos para inducir la proliferación de células CTLL-2, cuya capacidad de crecimiento depende de la cantidad de IL-2 presente en el medio.

Se eliminó del medio de cultivo de dichas células el factor de crecimiento, por medio de 3-4 lavados. Se colocaron 100 μ l de suspensión conteniendo 4000 células CTLL-2 en cada pocillo de una placa microtiter, junto con 100 μ l de una serie de diluciones del sobrenadante a ensayar, y se dejan en incubador de CO₂ a 37° C durante 20 h; al cabo de este tiempo, se añade 1 μ Ci de ³H-TdR a cada pocillo y, después de 6 h, se recogen los cultivos en un cosechador automático múltiple para determinar la incorporación de timidina tritiada (medida en c.p.m.) en un contador LKB para medir radiaciones beta.

Como control, en estos ensayos de actividad de IL-2, se utilizaron sobrenadantes de rata Lewis estimulados por Con A, cuya actividad se había valorado previamente respecto a la de un sobrenadante de células esplénicas de rata Wistar, CSIB-1, procedente del Instituto Suisse de Recherches Experimentales sur le Cancer, que contenía 150 U de IL-2/ml (1 U de IL-2 = 0.3 ng de IL-2 purificada a homogeneidad), respecto de una IL-2 humana semipurificada de origen comercial (Cellular Products, 120-150 u de IL-2/ml), y una IL-2 humana recombinante (Amersham ARN 1010 5x10⁵ u de IL-2/ml). Los datos se calculan según un análisis Probit de los resultados mediante programa informático.

Los sobrenadantes control de esplenocitos de rata Lewis se prepararon por disgregación del bazo según técnica habitual. El sedimento se suspendió a 37° C durante 3 min. A continuación añadimos medio K frío para detener la reacción, centrifugamos la suspensión 5 min a 250 x g. Las células del sobrenadante se ajustan a 5x10⁶/ml en medio K con 5% de FCS y se les añade Con A (5 μ g/ml), incubándose en frascos de cultivo, a 37° C en atmósfera al 5% de CO₂ y humedad a saturación. A las 24 h se centrifuga la suspensión celular a 200 x g durante 10 min por dos veces. El sobrenadante final se filtra a través de filtros Millipore con poro de 0.22 μ m y se conserva en congelación a -20° C hasta su utilización.

III.2.11.-Actividad citotóxica de células NK

Se basa en situar en el mismo medio células efectoras y células diana. Así, se seleccionan células linfoides del bazo, según se explicó previamente, y se enfrentan a células YAC-1 usadas como diana para células NK de ratón siguiendo el método descrito previamente por ROJO y cols., en 1986.

Las células YAC-1 se marcan con cromo ^{51}Cr cuando se encuentran en fase de crecimiento exponencial. Se recogen 5×10^6 células/ml, se centrifugan a $250 \times g$ durante 5 min, y se resuspenden en medio K. Se añade cromato sódico marcado con ^{51}Cr a razón de $0.1 \text{ mCi}/5 \times 10^6$ células, quedando éstas a una concentración final de 10^6 células/ml. Se incuban, en tubo, durante 60-90 min a 37°C en incubador con 5% de CO_2 y humedad a saturación, con agitación ocasional. A continuación se lavan 3 veces en MBSS y una vez en medio K, se centrifugan 5 min a $250 \times g$, para eliminar el ^{51}Cr sobrenadante. Se resuspenden en medio K y se ajustan a 10^5 células viables/ml, previo recuento con azul tripano.

Como células efectoras, en el ensayo de actividad NK se han utilizado suspensiones de esplenocitos murinos. Se lisan esplenocitos según el método habitual, y se ajusta la suspensión celular a 2×10^7 células/ml de medio K con 10% de FCS. A continuación se preparan mezclas de estas células efectoras con células YAC-1 (células diana) a distintas proporciones. Los ensayos se realizan mediante incubación durante 18 h en incubador de CO_2 y deteniendo la reacción con medio MBSS frío.

Los resultados se expresan en % de lisis específica o en unidades líticas, se considera una U.L. el número de células necesario para obtener un 33% de liberación específica de ^{51}Cr . Los datos de lisis obtenidos se procesan mediante programa informático (PORTOLES y MARQUEZ, 1987).

III.2.12.-Recuento de plaquetas

Para la cuantificación de plaquetas hemos utilizado el método indirecto de FONIO, según lo descrito anteriormente por SUAREZ- PEREGRIN (1947). Partimos de 0,1 ml. de sangre que se mezclan rápidamente con 500 μ l. de sulfato magnésico al 14%. Con esta mezcla se hacen varios frotis, que una vez secos se tiñen con MAY GRUMWALD-GIEMSA. En estas preparaciones se cuenta la proporción de hematíes y plaquetas en varios campos. Después, haciendo un recuento de hematíes, se puede calcular el número absoluto de plaquetas según la proporción previamente determinada de hematíes/plaquetas.

III.2.13.-Recuento de eosinófilos

Se utilizó como indicador de variaciones de actividad adreno-cortical (MARTIN y col., 1954; HOPWOOD y TIBOLLA, 1958); y se realizó el recuento directo por un método previamente descrito (SCHALM y col. 1985) usando el diluyente de PILOT (1950) a base de propilen-glicol. Con pipeta de globulos blancos se toma sangre hasta la marca 1.0 y se completa con el líquido de dilución hasta la marca 11.0; se agita la pipeta durante 2 minutos, se descarta el líquido diluyente de la porción capilar y se toman muestras del resto (en el que están suspendidas las células) para depositarlas sobre un hemocitómetro y realizar la lectura después de 15 minutos, tiempo en el que se lisan todos los linfocitos excepto los eosinófilos.

III.2.14.-Preparación de células para su utilización en citofluorometría de flujo (FACS)

Se utilizó esta técnica con propósitos de caracterizar fenotípicamente las subpoblaciones de linfocitos esplénicos mediante ciertos marcadores expresados en su membrana. Para ello se seleccionaron los anticuerpos anti-CD4 (Gk 1.5), anti-receptor D10 (3D3), anti-LAF 1 (M 17/52) y anti-Mac 1 (M 1/70).

En placas de 96 pocillos de fondo en U, se incubaron células D10 control, células D10 tratadas con Gk 1.5 y células de bazo de ratón BALB/c, en la proporción de 250.000 a 500.000 células/pocillo (50, 100 y 150 μ l de suspensión de células/pocillo). Se centrifugaron las placas a 1.600 rpm durante 2 minutos. Seguidamente se retiraron los sobrenadantes, se resuspendieron las células en Super-Mixer y se añaden los anticuerpos; éstos, previamente, se habían preparado a concentraciones adecuadas de 10 a 100 μ g/ml y de ellas se añaden de 75 a 100 μ l de la solución de anticuerpo, realizando después una buena suspensión por repetidas succiones con la pipeta automática. Antes de añadir los anticuerpos monoespecíficos se añade un 10 % de suero normal de rata o ratón (en función del origen de los anticuerpos) para evitar, mediante saturación las reacciones inespecíficas.

Estas suspensiones en placa, tratadas con los anticuerpos, se mantienen en nevera durante 30 minutos y después de centrifugar 2 minutos se retiran los sobrenadantes para resuspender y lavar tres veces con la "solución de tinción" (PBS + 2 % de suero fetal de ternera + 0,1 % de azida sódica), antes de añadir el segundo anticuerpo -generalmente acoplado con fluoresceína- que había de reconocer al primero.

Este segundo anticuerpo, se añadió y resuspendió como anteriormente, para después incubar las placas en nevera durante 30 minutos. Se efectuaron tres lavados, sin suero y con 0,1 % de azida (100 a 200 μ l). Se añadieron 100 - 200 μ l de p-formaldehído como fijador y se resuspendió como habitualmente, completando con PBS hasta 500 μ l/pocillo.

Las placas así dispuestas se cubrieron con papel de aluminio y se mantuvieron en nevera hasta su lectura en un citofluorímetro de flujo EPICS-C (Coulter), ajustado para excluir las células no viables.

III.2.15.- Determinación de niveles de corticosterona en suero.

La corticosterona, glucocorticoide endógeno secretado en ratones con un ritmo circadiano muy similar al de las ratas, fué determinada por HPLC siguiendo el método de SHIMIZU y col. (1983). En resumen, este método consiste en extraer la corticosterona de una muestra de 200 μ l de suero con 0,05 ml de NaOH 0,25 M y 4 ml de cloruro de metileno en un pequeño embudo de decantación; después de agitar durante 1 minuto, se deja decantar y se lava a continuación, con agua, la capa de disolvente orgánico, transfiriéndola a un erlenmeyer de 5 ml donde se evapora en vacío a 30° C. El residuo se disuelve en 50 μ l de metanol y se inyectan 25 μ l de solución en una columna de vidrio.

Para la curva de calibración se utilizó solución de albúmina al 3 % con concentraciones variables de corticosterona (5 a 30 μ g/100 ml) y se dispone un estándar interno de 10 μ g/100 ml.

Como fase móvil empleamos una mezcla de acetonitrilo: sulfúrico al 0,03 % (40:60), trabajando a 30° C.

En primer lugar se preparan muestras control de suero de ratón con 300 ng/inyección de cada patrón interno, obteniendo espectros como el representado en la Fig. 11 para caracterizar en la escala de tiempos el tipo de molécula y con estos datos determinar la corticosterona en las distintas muestras de suero de ratón.

III.3.-ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

Para el análisis y comparación de datos, tanto de DL_{50} como TL_{50} , se utilizó un programa informático (MARQUEZ y col. 1990). Las relaciones entre índice de supervivencia y tiempo fueron ajustadas mediante líneas de regresión por mínimos cuadrados y calculados sus índices de correlación. La comparación estadística de medias se realizó mediante t de Student, para datos independientes, tras comprobar las condiciones de aplicación. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de $p \leq 0,05$.

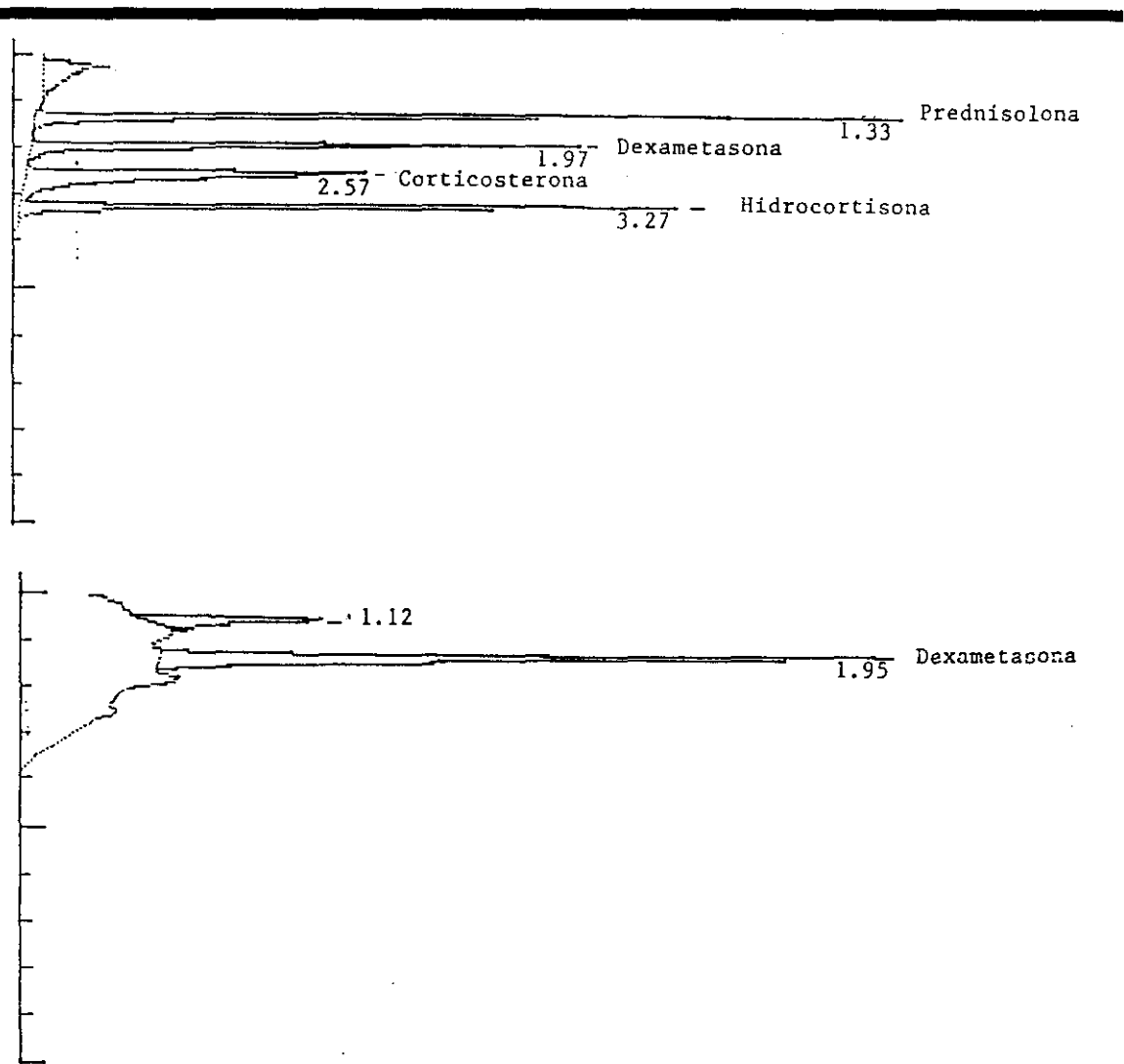


Fig. 11.-Perfiles de espectros-patrón de diversas moléculas determinadas por HPLC según el método de SHIMIZU y col. 1983.

IV. RESULTADOS.

En primer lugar consideramos necesario realizar algunos estudios preliminares en relación con los modelos experimentales que van a ser ensayados. Su puesta a punto requiere, tanto el conocimiento de las posibilidades de ejecución, como la cuantificación de alteraciones en el estado de salud física de los animales y de las variaciones en aquellos parámetros que puedan ser reflejo de su estado anímico, nutricional y de desarrollo. Los datos obtenidos permiten establecer condiciones técnicas normalizadas y conocer algunos parámetros-tipo sobre los que determinar posibles variaciones, que reflejen alguna interacción neuroinmunitaria.

IV.1.- ESTUDIO PREVIO DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES

IV.1.1.-Modelos experimentales de estrés.

Según se indica en el apartado de métodos, son cuatro los procedimientos utilizados en este estudio para producir distintos cuadros de estrés: a) hacinamiento (**HAC**); b) aislamiento (**AIS**); c) inmovilización (**INM**); y d) morfina-dependencia (**MFN**).

En principio se establece un examen comparativo, en cuanto a distintos parámetros del comportamiento (Tabla VI), para disponer de unos perfiles de actitud en cada caso. Se objetivó una disminución moderada del **peso**, en proporciones variables para todos los modelos (entre el 2 y 6% respecto a los controles; p= no significativo), excepto en el de aislamiento, que experimentó un leve incremento (7% respecto a los controles) que se correlaciona con un mayor consumo de nutrientes. La **actividad motora** se ve muy aumentada en las situaciones de aislamiento y morfina-dependencia, acompañada en el último caso de **intranquilidad**, **irritabilidad**, y **tensión muscular** aumentadas. Como era de esperar, en los animales morfina-dependientes se incrementa significativamente la

Tabla VI .-Efecto de las distintas situaciones de estrés, mantenidas durante una semana, sobre peso, nutrición y algunos parámetros de comportamiento, en ratones BALB/c.

MODELO Experimental	Actividad Motora	Intranquilidad	Irritabilidad	Analgesia (a)	Tensión Muscular	Cambio de Peso	Consumo comida	Consumo agua
Control	+	-	-	12±1	70±2 (b)	100% (c)	17±2 (d)	16±3 (e)
Aislamiento	++	-	±	14±5	75±5	107%	12±2	14±1
Hacinamiento	±	++	++	9±2	128±7	94%	8±5	10±3
Inmovilización*	-(p)	-(p)	No	8±4	19±2	98%	10±3	17±2
Morfinodep.	+++	+++	+++	26±3	153±12	96%	6±4	20±5

(p) este signo aparece cuando es provocado.

(a) tiempo que tarda el ratón en elevar las patas posteriores cuando se le deposita sobre una placa caliente (56°C).

(b) tiempo que tarda en soltarse de una malla de alambre de 60 g cuando es suspendido por el rabo.

(c) la variación de peso se evalúa a las dos semanas de iniciar el modelo, y se expresa en % respecto al peso del grupo control para el mismo tiempo.

(d) el consumo de comida se expresa en gr/100 gr peso de animal y día

(e) el consumo de agua se expresa en ml/100 gr de peso de animal y día

(*) en el subgrupo con posibilidad de liberación disminuye el índice de analgesia (7±2 s) y aumenta la tensión muscular (102±6 s).

analgesia, con cambios variables en los otros modelos.

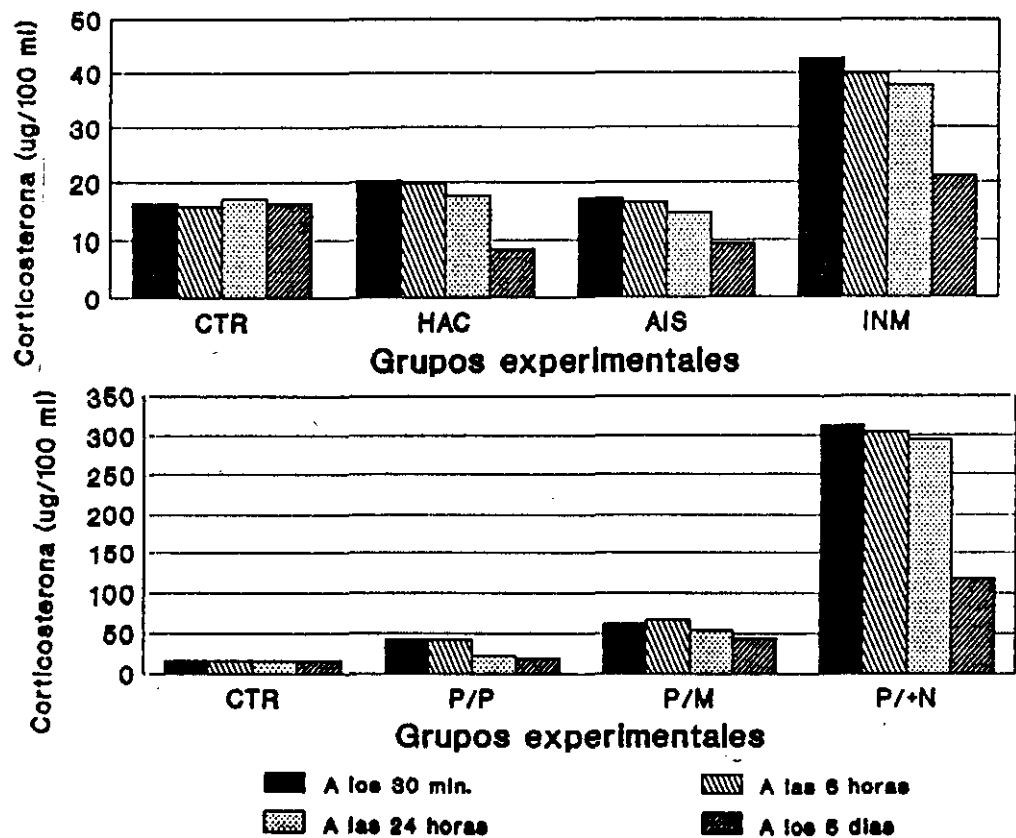
Nos llamó la atención el hecho, inicialmente accidental, de que cuando en el grupo de animales sometidos a inmovilización, alguno de ellos tenía posibilidad de autoliberación, sus parámetros de intranquilidad, analgesia y tensión muscular se modificaron con relación al resto del grupo experimental (Tabla VI). Esto nos llevó a establecer, en algunas ocasiones, dentro del grupo de estrés por inmovilización forzada, un subgrupo al que se le daba una cierta posibilidad de autoliberación.

Para cuantificar el grado de estrés alcanzado en los distintos modelos experimentales, se han controlado las variaciones de glucocorticoides endógenos en el suero de ratones, efectuando siempre las determinaciones entre las 12 y 13 horas del día y a los 30 a 45 minutos de haber finalizado la situación de estrés. De este modo evitamos variaciones debidas al ritmo circadiano (SHIMIZU y col.,1983).

Las determinaciones se repitieron a las 6 y 24 horas, y 6 días más tarde, para comprobar las posibilidades de recuperación; los datos obtenidos se resumen en las Figs. 12 y 13. En ellas se observa una elevación significativa de los niveles de corticosterona en el modelo de inmovilización a los treinta minutos (media \pm ds: $42,5 \pm 5,2$; $p \leq 0,05$), y a las seis horas de terminar la inmovilización (media \pm ds: $39,8 \pm 4,7$; $p \leq 0,05$). Así se comprobó que el nivel de COR iba disminuyendo progresivamente en función del tiempo, para normalizarse a los seis días. Sin embargo, las modificaciones observadas en los modelos de HAC y AIS son poco relevantes, demostrando con ello el menor nivel de estrés alcanzado (Fig. 12).

En cuanto a los estados de ansiedad producidos durante situaciones de morfinodependencia, se observa una elevación a los 30 minutos, que continúa a las 6 horas (media \pm ds. $61,8 \pm 8,6$ y $66,5 \pm 5,9$ respectivamente; $p \leq 0,01$), disminuyendo con posterioridad.

Quisimos estudiar el fenómeno con más detenimiento, produciendo síndromes de



Figs. 12 y 13.-Niveles de corticosterona sérica (COR) de ratones BALB/c sometidos a situaciones de estrés: Hacinamiento (HAC), Aislamiento (AIS), Inmovilización (INM), Morfinodependencia (MFN), "Pellet"placebo (P/P) y Síndrome de abstinencia (P+N). Las determinaciones se hacen en diferentes tiempos a partir de que finalice la situación de estrés.

abstinencia mediante la administración subcutánea de naloxona (Nx) (1 mg/Kg) y utilizando, como controles, ratones a los que se había implantado un "pellet"-placebo sin morfina. En la Fig. 13 se expresan las variaciones producidas a los 30 min (media \pm ds: 312 ± 23 ; $p \leq 0,001$ respecto al control, $p \leq 0,01$ respecto a MFN), 6 horas (media \pm ds: 308 ± 18) y 24 horas (media \pm ds: 295 ± 17) de desencadenar dicho síndrome de abstinencia. En el grupo placebo, con o sin inyección de Nx, no se observaron modificaciones significativas.

IV. 1.2.- Modelos de anafilaxia experimental.

IV.1.2.1.-Anafilaxia sistémica pasiva (PSA).

Partimos, como referencia, de la **curva de precipitación cuantitativa** establecida en el método original con endotoxina y suero anti-*B. abortus* y sobre ella señalamos las zonas de equivalencia y las cinco proporciones de Ag/Ac sobre las que es posible realizar este estudio previo (Fig. 14). Así diferenciamos entre el punto de máxima precipitación (relación Ag/Ac = 1/1), dos puntos con exceso de anticuerpo (relaciones Ag/Ac = 0,25/1 y 0,5/1) y otros dos más en la zona con exceso de antígeno (relaciones Ag/Ac = 2/1 y 3/2).

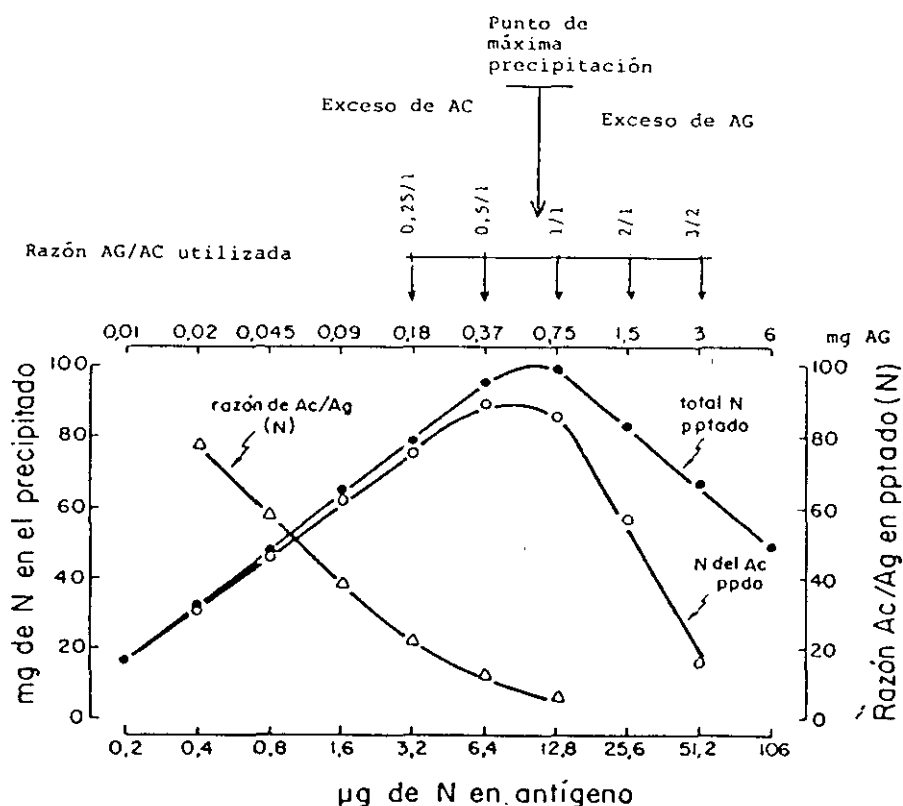


Fig. 14.-Curva de inmunoprecipitación cuantitativa, entre EDTX de *Brucella abortus* y su anti-suero específico de conejo. Sobre ella se señalan las distintas proporciones de Ag/Ac y se utiliza como patrón de referencia.

Realizamos curvas de precipitación en función de la dosis de antígeno para distintas toxinas (*B. abortus*, *E. coli*, *Y. enterocolítica*), como aparece en la Fig. 10 del apartado de métodos, seleccionando la EDTX de *B. abortus* por presentar mayor precipitación de inmunocomplejos "in vitro".

Hemos comprobado previamente las **diferencias de toxicidad** de distintas moléculas endotóxicas sobre ratones BALB/c, C57Bl/6, y C3H; estos últimos, en principio, con una mayor resistencia a la acción endotóxica directa, tal como se resume en la Tabla VII. Los valores obtenidos en estos ensayos demuestran que, en efecto, el fenotipo C3H precisa dosis mucho mayores de endotoxina (EDTX) para producir efectos similares, por lo que a las dosis empleadas en nuestros ensayos, puede considerarse resistente a la acción endotóxica. El resto de los valores de DL₅₀ son comparables a los datos obtenidos por otros autores para distintas endotoxinas procedentes de enterobacterias (BAKER y WILSON, 1965; LEONG y col. 1970; DIAZ y BOSSERAY, 1974).

Utilizando estas proporciones de suero/endotoxina se pueden desencadenar cuadros de shock anafiláctico por inmunocomplejos (IC). Determinamos el TL₅₀ e índice de

TABLA VII.- Variaciones encontradas en los valores de DL50 (µg/ratón) para ratón, según el tipo de molécula endotóxica y la raza del animal.

Estirpe murina	<u>B. abortus</u>	<u>Y. enterocolitica</u>	<u>E. coli</u>
BALB/c	258	135	199
C57Bl/6	296	137	203
C3H	>1600	>1600	>1600

1.-Las moléculas endotóxicas fueron obtenidas por el Dr. Ramón Díaz en la Universidad de Navarra.

2.-Valores referidos a ratón de 28 ± 0.7 gr. e inyección i.v. de 0,1 ml. de endotoxina.

mortalidad en los distintos grupos de animales pertenecientes a las tres **razas de ratones** seleccionadas en principio (Fig. 15). Así encontramos que la raza BALB/c resulta la más apropiada para este estudio, ya que las demás razas desarrollan TL_{50} excesivamente cortos para valorar variaciones posteriores (en algunas ocasiones inferiores a dos horas). Por otro lado, esta raza es la más sensible a las variaciones en la proporción Ag/Ac.

Seguidamente, en el gráfico de la Fig. 16, se comparan los resultados de TL_{50} obtenidos en función de las distintas relaciones Ag/Ac, para dos **grupos de edad** (8 y 36 semanas) de ratones BALB/c, observándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las diferentes proporciones Ag/Ac para los ratones de 8 semanas. Los animales de 36 semanas presentaron una menor actividad inmune, con TL_{50} prolongado, mayor dispersión de resultados, y diferencias menos significativas para diversas proporciones de Ag/Ac. Estas variaciones pueden deberse a una disminución de la actividad inmune en los animales más viejos.

A la vista de estos datos y dado que la relación Ag/Ac=1:1 ya ha sido objeto de estudios previos (PORTOLES y col., 1986), decidimos limitar el análisis del fenómeno anafiláctico a dos situaciones extremas en las que existe un exceso de antígeno (Ag 3/Ac 2) o, por el contrario, un exceso de anticuerpo (Ag 0,25/Ac 1). En el primer caso se producirán IC más pequeños, de más rápida eliminación, y con activación del Complemento; mientras que en el segundo, se formarán macrocomplejos Ag/Ac de lenta eliminación y sin capacidad de activar el Complemento.

Es lógico suponer que los IC formados "*in vivo*" difícilmente van a mantener las proporciones de los elementos reaccionantes inyectados, antígeno y anticuerpo, como sucedería en una inmunoprecipitación "*in vitro*"; pero lo que sí es evidente, según se deduce de los resultados que hemos obtenido (Fig. 16), es que se observan modificaciones en el carácter patogénico de los IC formados que parecen mantener una cierta relación con las dosis de antígeno inyectadas.

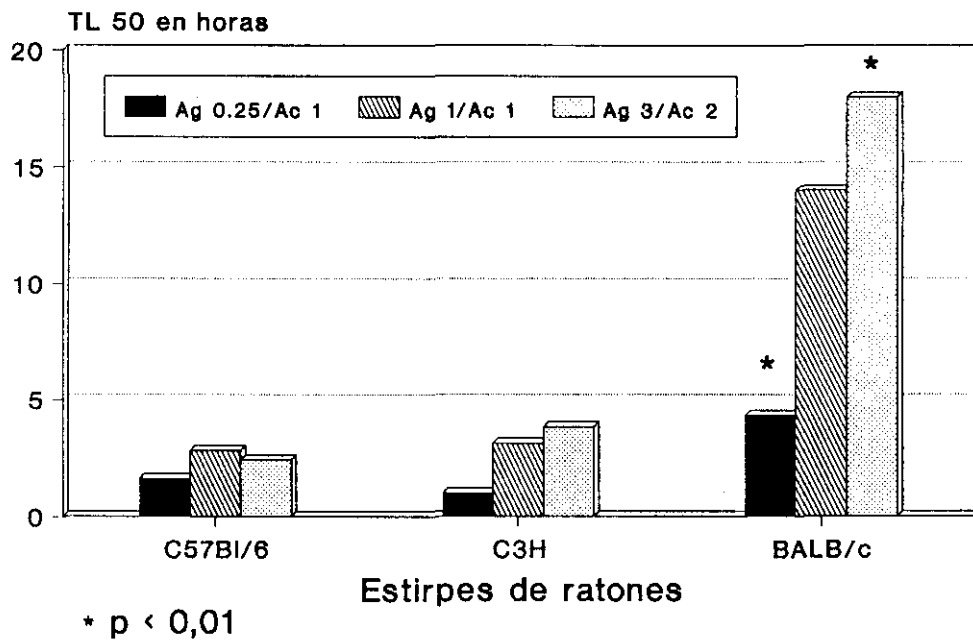


Fig. 15.-Determinación del TL₅₀ en diferentes razas (BALB/c, C3H y C57Bl/6) de ratones sometidos a reacciones de PSA con tres proporciones de Ag/Ac distintas.

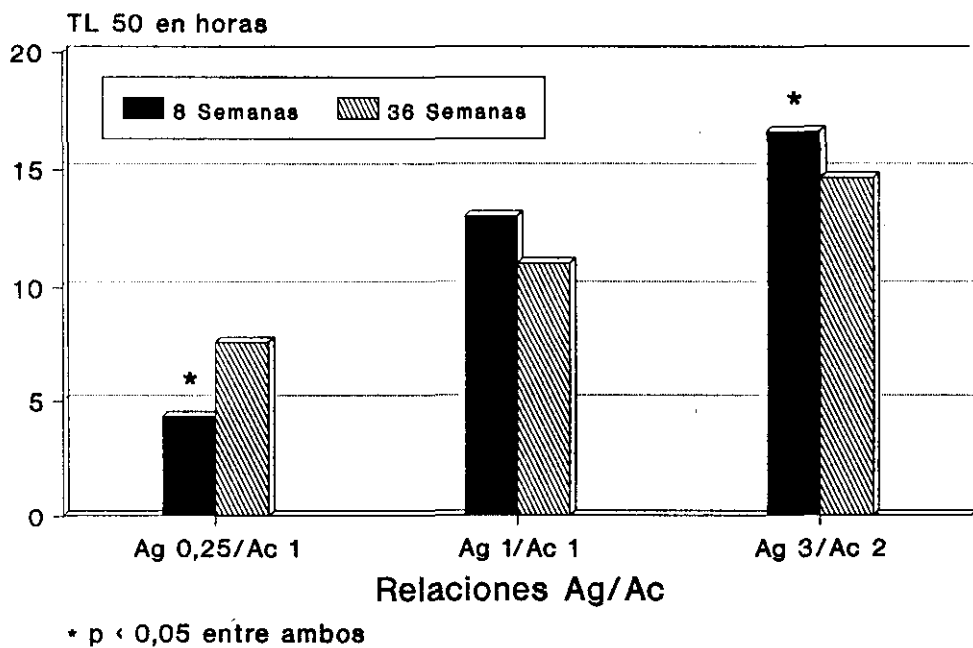


Fig. 16.-Variaciones del TL₅₀ en función de la edad (8 y 36 semanas) en ratones BALB/c sometidos a reacciones de PSA con tres proporciones Ag/Ac distintas.

Se han ensayado tratamientos con **Suramina**, un inhibidor del sistema de Complemento, para completar el estudio de los modelos de PSA con varias proporciones de Ag/Ac. De este modo, se demostró que las diferencias de presentación en el cuadro de PSA con exceso de Ag o de Ac, disminuyen al inhibirse este sistema. Lo cual aporta otro dato a favor de que la diferencia de activación del Complemento observada "*in vitro*", se mantiene en el modelo de PSA (Tabla X).

También se realizaron ensayos de reacciones de anafilaxia sistémica (PSA) con el sistema homólogo BSA-antiBSA. Como se puede comprobar en la Fig. 17, la reacción de PSA heteróloga y con antígeno endotóxico es más intensa que cuando se ensaya antisuero de ratón (anti-BSA) con albúmina bovina (BSA= TL₅₀ media: 12.8 horas, Mortalidad 58.3%; EDTX= TL₅₀ media: 7.6 horas, Mortalidad 91,6%)

IV.1.2.2 Anafilaxia cutánea pasiva.

En la reacción de **anafilaxia cutánea pasiva (PCA)**, que constituye el otro modelo ensayado de inmunidad en animal vivo, se trata de producir anticuerpos dermo-sensibilizantes, y desencadenar después una reacción dérmica con el antígeno correspondiente.

Empezamos por determinar el intervalo óptimo de inmunización con albúmina bovina (BSA), con objeto de obtener en suero, un nivel suficiente de anticuerpos reagínicos que permita desencadenar, posteriormente, la reacción de PCA. Para ello, se establecen diferentes intervalos entre la administración intraperitoneal de BSA, y la obtención del suero; estos sueros se emplean para desarrollar reacciones de PCA. La Fig. 18 muestra la relación entre los intervalos de inmunización, y las lesiones dérmicas obtenidas. De este modo, obtenemos un intervalo óptimo próximo a los 10-12 días, para las dos razas de ratón ensayadas (BALB/c, C3H).

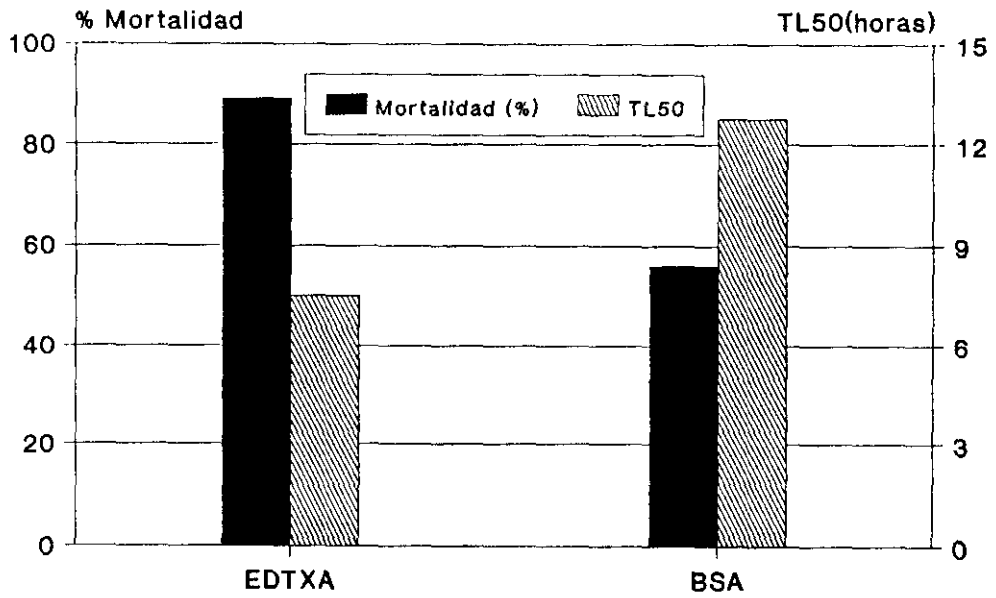


Fig. 17.-Estudio de reacciones de anafilaxia (PSA) producidas en ratones BALB/c para dos sistemas antigénicos: homólogo BSA-antiBSA y heterólogo EDTX-antiEDTX. Se determina TL₅₀ y % de mortalidad.

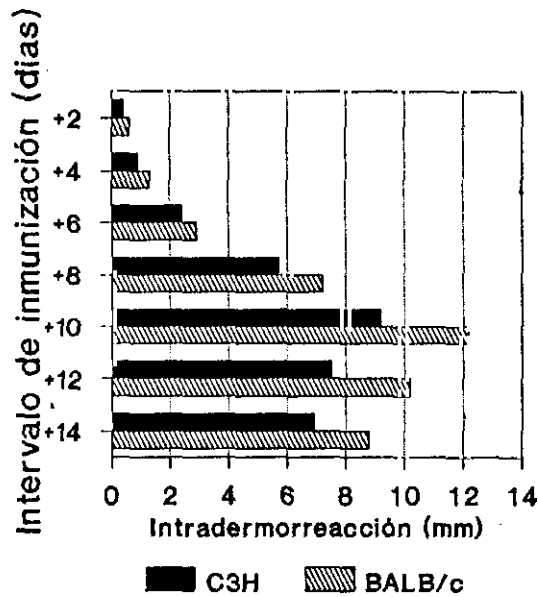


Fig. 18.-Influencia del intervalo de inmunización utilizado para la obtención del antisuero (frente a BSA), en el posterior desarrollo de reacciones de PCA (piel completa). Se indican los diámetros de lesiones obtenidas para cada antisuero en dos razas de ratones.

Después, determinamos el intervalo óptimo entre la administración intravenosa del antisuero y la intradérmica del antígeno (**modelo PCA de piel completa**), lo que señala la persistencia de los anticuerpos dermatropos ligados a los mastocitos de las capas epidérmicas (Fig. 19). En ambos ensayos utilizamos dos razas de ratones con distinto grupo H-2 para ver la influencia del sistema de histocompatibilidad en la reacción.

Como se puede ver, por los datos obtenidos, una reacción óptima para nuestros propósitos experimentales se obtiene con suero de ratones BALB/c inmunizados 10 días antes con albúmina bovina, de los que se obtiene el suero sensibilizante, y manteniendo un intervalo comprendido entre 4 y 6 días desde la administración intravenosa del antisuero a la intradérmica del antígeno.

También se han realizado reacciones de PCA con los sistemas antigénicos finalmente seleccionados (EDTX y BSA) para establecer comparaciones dependiendo de: a) la influencia por la homología existente en el anticuerpo sensibilizante; y b) según que el tipo de sensibilización fuera sistémico (piel completa) o cutáneo (reacción revertida a nivel local). Se demuestra que las dosis sensibilizantes son mayores para el sistema EDTX-antiEDTX, en el modelo de piel completa, que para el sistema BSA-antiBSA (0.25 ml vs 0.08 ml); obteniéndose una lesión de menor diámetro (5mm vs 8mm). Por este motivo, seleccionamos el sistema homólogo BSA-antiBSA, en las dos modalidades de sensibilización, para el estudio de las reacciones de anafilaxia cutánea (Fig. 20).

IV. 1.2.3. Nivel de estrés en los modelos PSA y PCA

Una vez normalizadas las condiciones experimentales en los modelos de anafilaxia, determinamos las variaciones que se producen en los niveles séricos de corticosterona en cada momento del ensayo. Así comprobamos si las manipulaciones a que son sometidos los ratones, dificultan la correcta interpretación de los resultados. En la Fig. 21 se resumen los cambios en el nivel de COR al administrar los diferentes agentes. La administración de

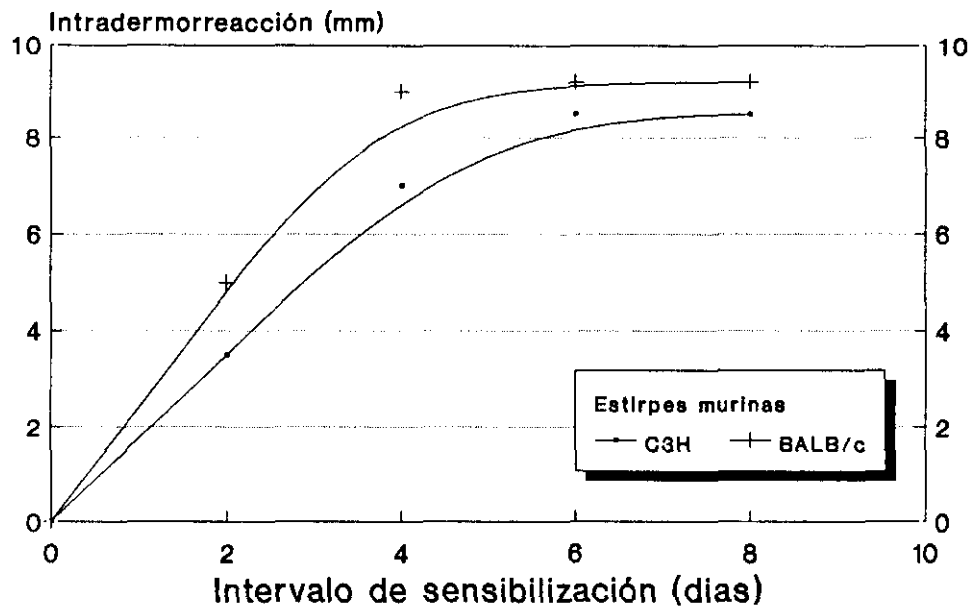


Fig. 19.-Variaciones en la reacción de PCA en función del intervalo entre la administración del antisuero (obtenido en intervalo óptimo) y el antígeno; ensayado en dos razas de ratones.

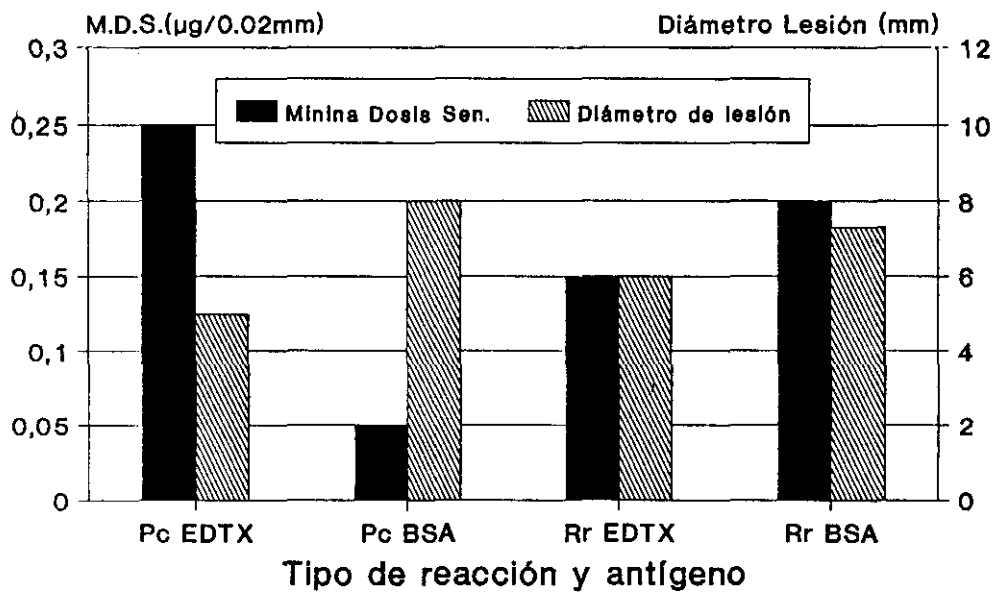
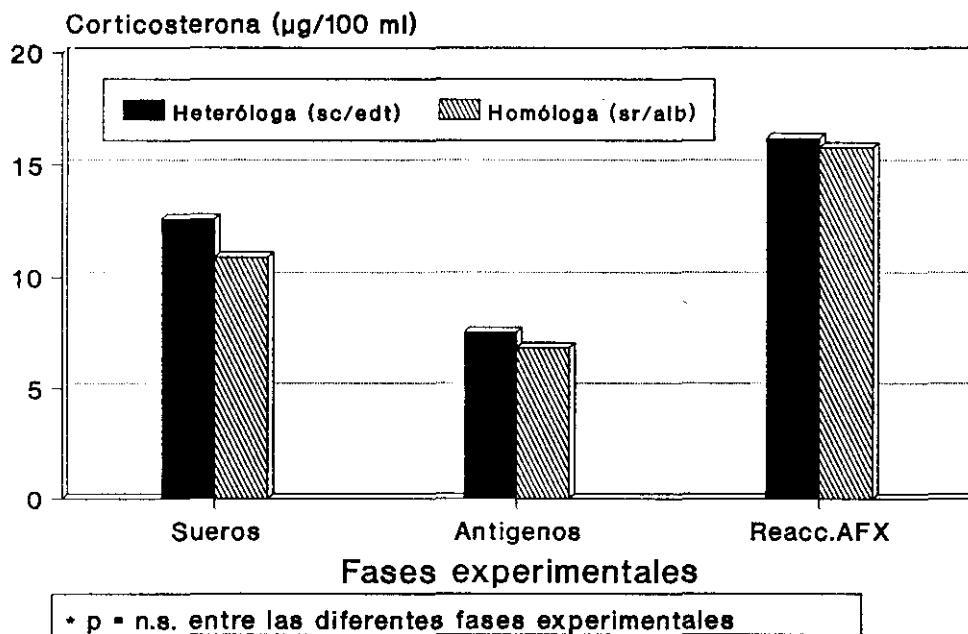
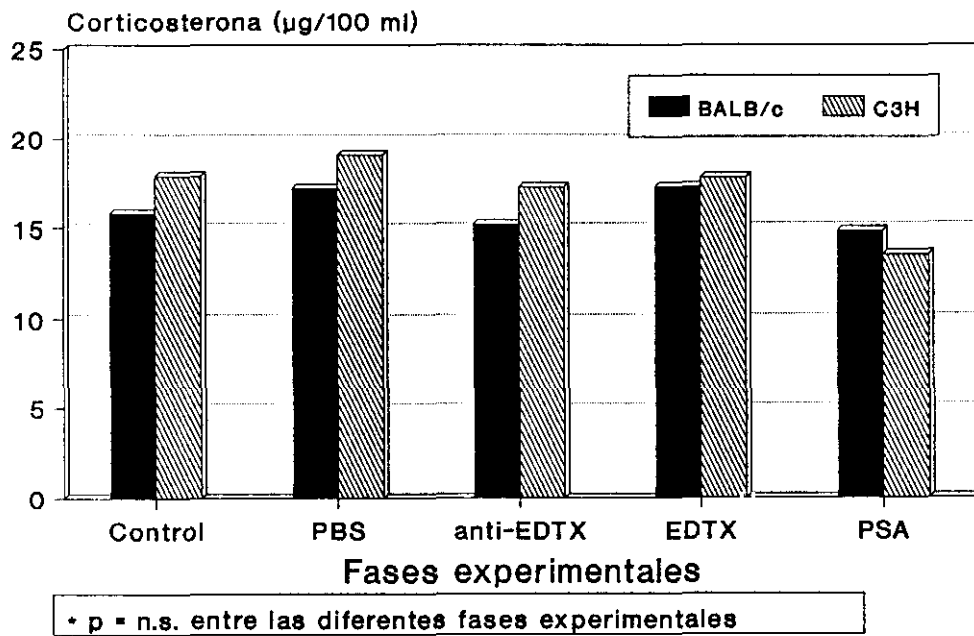


Fig. 20.-Parámetros de la reacción anafiláctica (mínima dosis sensibilizante y tamaño de lesión obtenida) para dos modelos de PSA (piel completa y reacción revertida local), con dos sistemas antigénicos (EDTX y BSA).

0,1 ml de PBS o de 0,1 ml de suspensión de antígeno de *Brucella* produjeron leves variaciones sin significación estadística. La administración de antisuero frente a EDTX tampoco produjo cambios estadísticamente significativos. La disminución de corticosterona es menor aún, cuando se ensaya en un sistema homólogo sin intervención de endotoxina (resultados no mostrados). La estirpe C3H revela unos cambios similares. En su conjunto las diferencias no son importantes, y por tanto podemos descartar en principio desviaciones metodológicas significativas.

Cuando esta determinación de corticosterona se efectúa en las reacciones **PCA**, también se comprueban ligeras variaciones, aunque de signo contrario a las anteriores. Por ejemplo, la inyección intradérmica de suero produce una discreta elevación en el nivel esteroide, que es algo más acentuada en presencia de suero de conejo heterólogo (Fig. 22); mientras que con la inyección intravenosa del antígeno se produce, en ambos casos, una disminución de la cantidad de corticosterona en suero. En situaciones en las que se produce la reacción PCA, se observa un aumento del nivel de corticosterona, que es transitorio, puesto que comprobamos su descenso a las 6 horas.

En conjunto, podemos afirmar que para ambas reacciones, las variaciones en los niveles de corticosterona durante el desarrollo del modelo experimental son moderadas, y no muestran un patrón determinado. Aún siendo más marcadas en el modelo EDTX-antiEDTX, carecen de significación; y por tanto no interferirán en las determinaciones a realizar posteriormente.



Figs. 21 y 22.-Determinaciones de corticosterona sérica (COR) en cada una de las fases experimentales de las reacciones de PSA (fig. 21, arriba) y PCA (fig. 22, abajo).

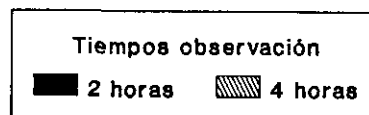
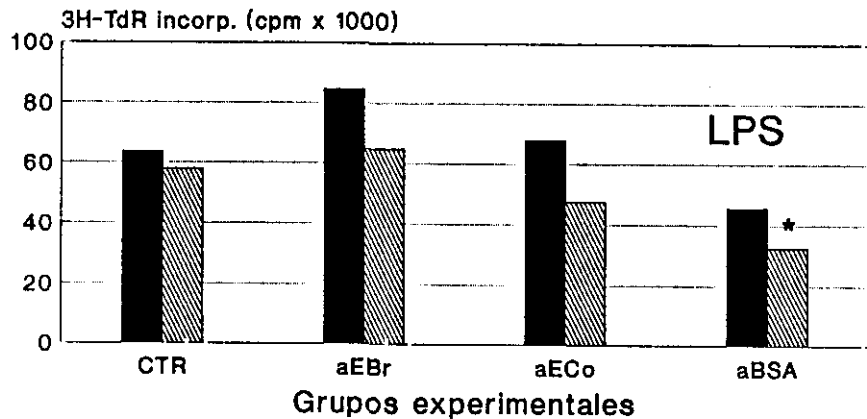
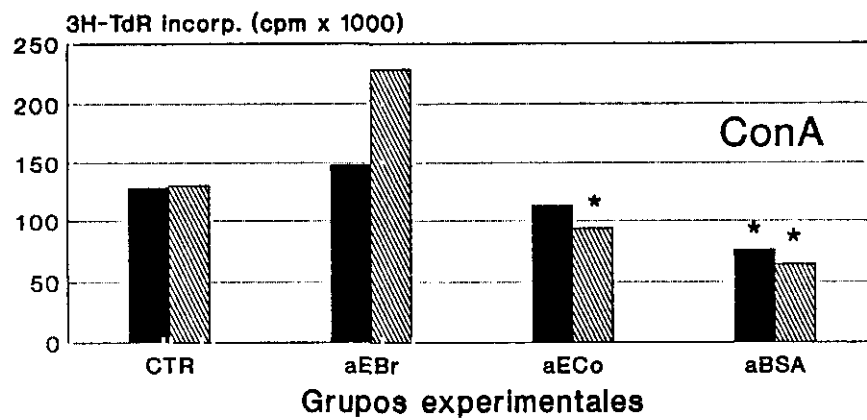
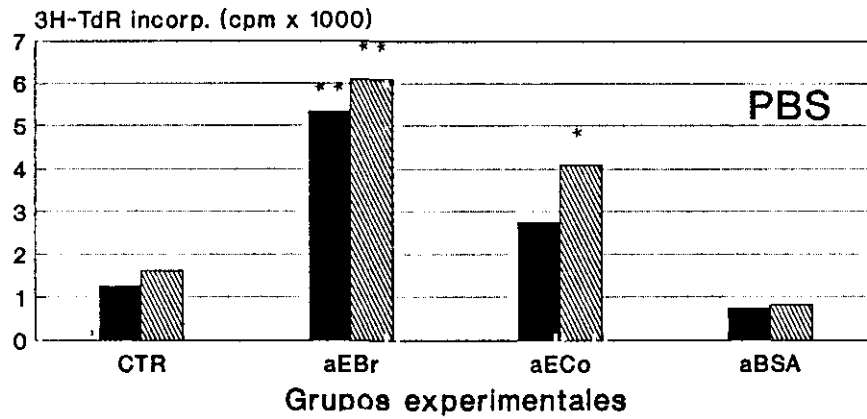
IV.1.2.4. Perfil inmunológico de la respuesta anafiláctica.

Para comprender mejor las posibles modificaciones de respuesta anafiláctica durante las situaciones de estrés, determinamos las variaciones de diversos parámetros inmunofarmacológicos durante el proceso de reacción **anafiláctica sistémica (PSA)**. Para ello, cuantificamos las respuestas blastogénicas mitógeno-inducidas, la síntesis de IL-2 y la actividad citotóxica de células NK.

Realizamos los ensayos en el modelo de reacción anafiláctica frente a inmunocomplejos anti-endotoxina de *Brucella* (aEBr) y *Colibacilo* (aECo) y frente a inmunocomplejos anti-albúmina (aBSA), en una proporción equivalente Ag/Ac. En estos tres grupos las determinaciones se efectuaron al cabo de 2 y 4 horas después de inyectar el agente desencadenante del posible shock anafilático.

Los resultados obtenidos, en relación con la **respuesta linfoproliferativa**, se resumen en las Figs. 23 a, b y c. Como puede verse, se produce una significativa estimulación de la mitogénesis intrínseca (PBS) en presencia de EDTX de *Brucella* (420% respecto a respuesta control, $p \leq 0.01$). Este efecto queda enmascarado al estudiar la respuesta blastogénica en presencia de mitógenos (ConA= 110% y LPS= 132%; respuestas respecto al control $p = n.s.$) por la interacción de las sustancias activadoras de linfocitos T y B (ConA y LPS respectivamente). En el caso del sistema inespecífico de EDTX de *E.coli*, frente a suero anti-*Brucella*, aparece un efecto mitogénico intrínseco menor (200%), presentando incluso una inhibición al interactuar con ConA (78%). En todos los casos de PSA, con utilización del sistema BSA-antiBSA, se observa una inhibición variable de la respuesta blastogénica, que solo es significativa en las determinaciones realizadas con mitógenos (ConA y LPS) a las 4 horas de desencadenar la reacción de PSA (Fig. 23).

La actividad de células T, valorada en función de su capacidad de **producción de IL-2** en respuesta a mitógenos, se ve incrementada en ambos modelos endotóxicos (*B. abortus* y *E.coli*). Este efecto se aprecia a las 6 horas de producirse el cuadro de PSA (con



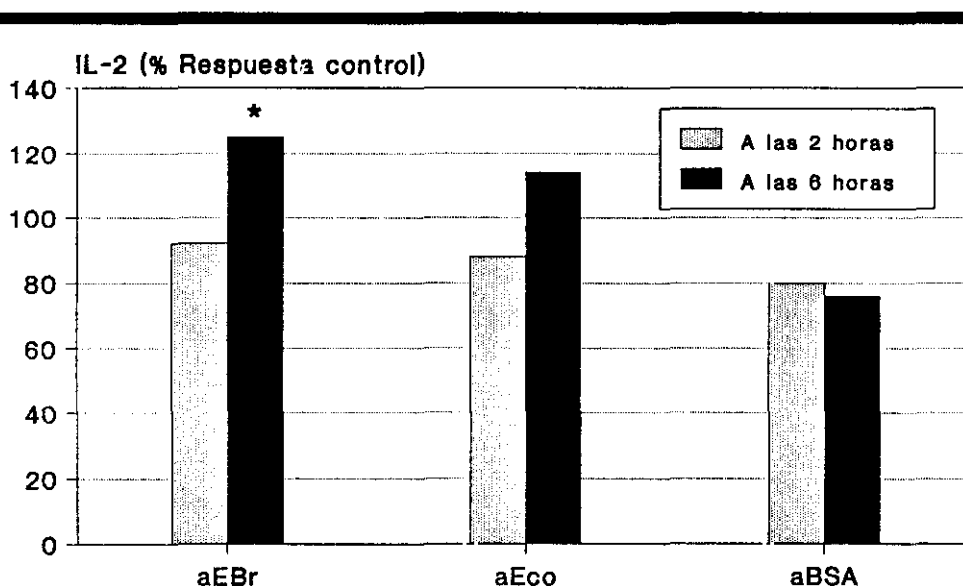
* p < 0,05 ** p < 0,01

Fig. 23.-Blastogénesis intrínseca "ex vivo" (PBS) y en presencia de mitógenos (ConA, LPS), utilizando esplenocitos obtenidos de ratones sometidos a situaciones de anafilaxia sistémica (PSA). Se muestran 4 grupos experimentales: control(CTR), EDTX de *Brucella* (aBr), EDTX de *E. coli* (aEc) y albúmina bovina (BSA).

126% y 114% de respuesta respecto al control, respectivamente). Sin embargo, el modelo BSA-antiBSA presentó una disminución de la respuesta que se mantuvo a las 6 horas (Fig. 24).

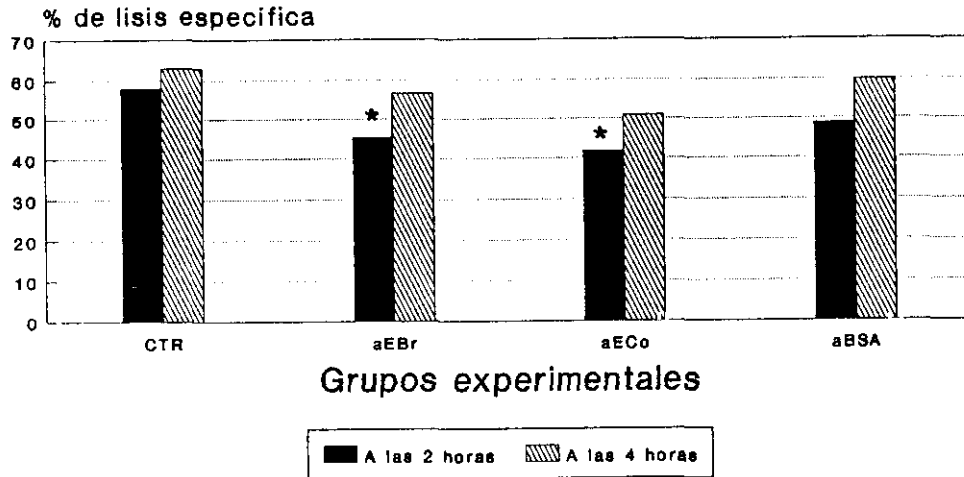
La **actividad de células NK** se valoró por su citotoxicidad frente a células YAC-1, apreciándose una inhibición variable en todos los casos, y que es menos acusada en el caso del sistema homólogo BSA-antiBSA. Para el modelo de PSA con EDTX de Brucella, se objetiva una disminución del 13% (45% de lisis específica frente al 58% en el grupo control; $p < 0,05$) que tiende a normalizarse a las 4 horas (Fig. 25).

Por otra parte, en estos cuadros de anafilaxia, sea cual fuere el agente sensibilizante (EDTX o BSA) (Fig. 26), aparece una ligera disminución (variable según los casos) en los niveles de corticosterona, un acusado aumento en el número de **eosinófilos** (que pasan en sus valores medios de 93,7 Eos/ μ l a 165,6 Eos/ μ l para EDTX, $p < 0,05$; y a 156,2 Eos/ μ l para BSA, $p < 0,05$) y una disminución en el número de **plaquetas** circulantes (que pasan de 140.000 Pq/ μ l a 58.800 Pq/ μ l para EDTX, $p < 0,05$; 92.430 Pq/ μ l para BSA, n.s.) (Fig. 26).



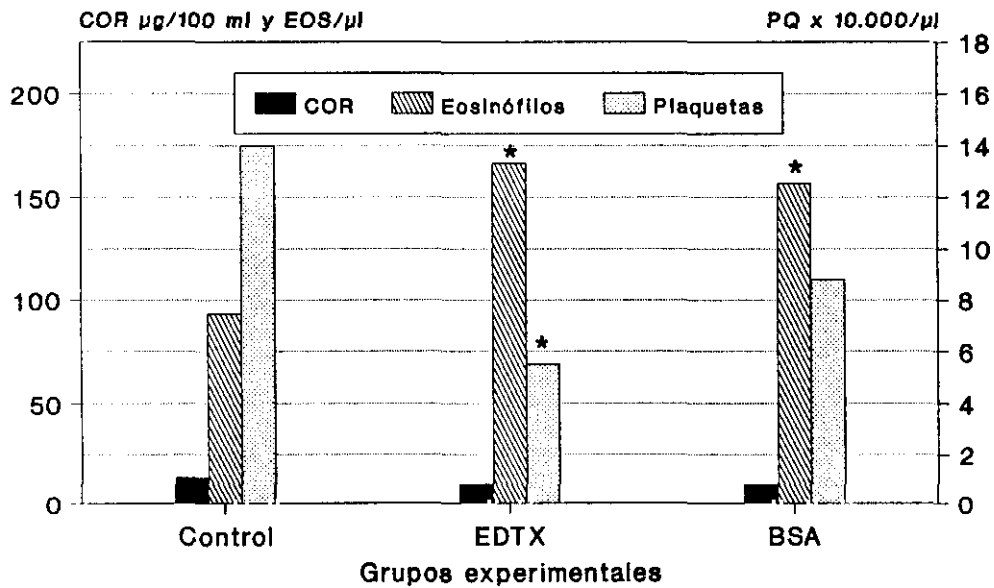
* $p < 0,05$

Fig. 24.-Producción de IL-2 (% respecto al control) en ratones BALB/c sometidos a PSA por tres sistemas Ag/Ac diferentes. Se determinan a las 2 y 6 h. de iniciar el cuadro.



* $p < 0,05$

Fig. 25.-Actividad de células NK obtenidas de ratones BALB/c sometidos a reacciones de PSA para tres sistemas Ag-Ac. Se determinan a las 2 y 4 h., se expresa como % de lisis específica de células YAC-1.



* $p < 0,05$ frente al control

Fig. 26.-Determinaciones de corticosterona (COR), eosinófilos (EOS) y plaquetas (PQT) en ratones BALB/c sometidos a reacciones de PSA frente a dos tipos de antígenos (EDTX y BSA).

IV.2. RESPUESTA INMUNE EN SITUACIONES DE ESTRÉS EXPERIMENTAL

IV.2.1.-Perfil Inmunofarmacológico en situaciones de estrés.

En este apartado estudiamos las modificaciones que el estrés produce en la respuesta inmune a nivel celular. Iniciamos el estudio obteniendo el bazo del ratón sometido a una situación de estrés mantenida durante una, dos, o tres semanas, para cuantificar el **número de esplenocitos totales** por animal. Los resultados se expresan en la Fig. 27, observándose en la primera semana una marcada disminución (estadísticamente significativa) para el modelo de inmovilización, mientras que el aislamiento no provoca apenas cambios en este tiempo. Los modelos de hacinamiento, y aislamiento requieren dos o tres semanas, respectivamente, para alcanzar una depresión similar a la de la primera semana de inmovilización, que tenga significación estadística ($p < 0,05$).

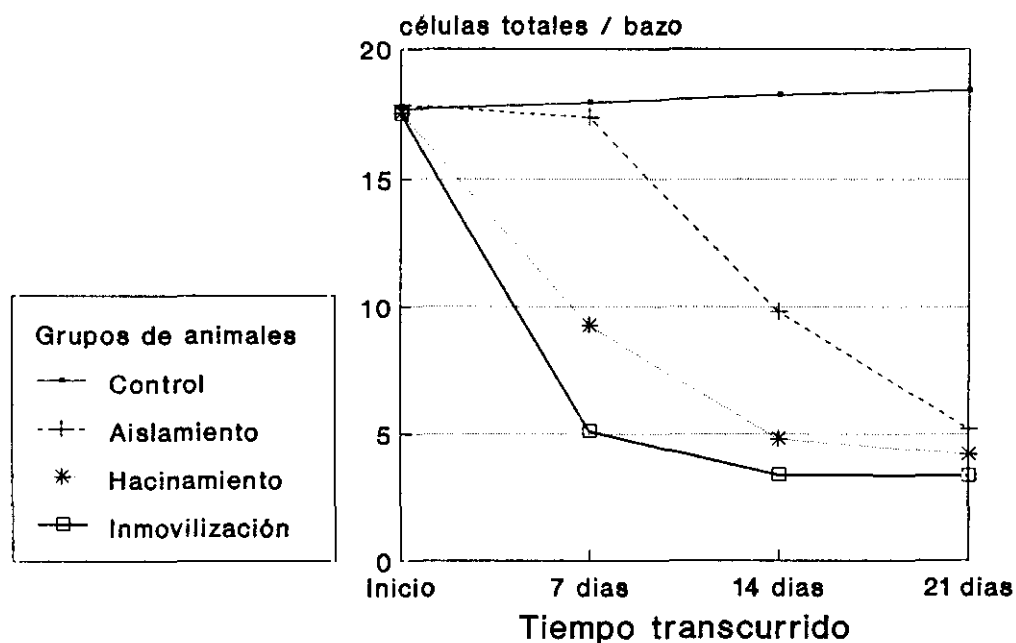
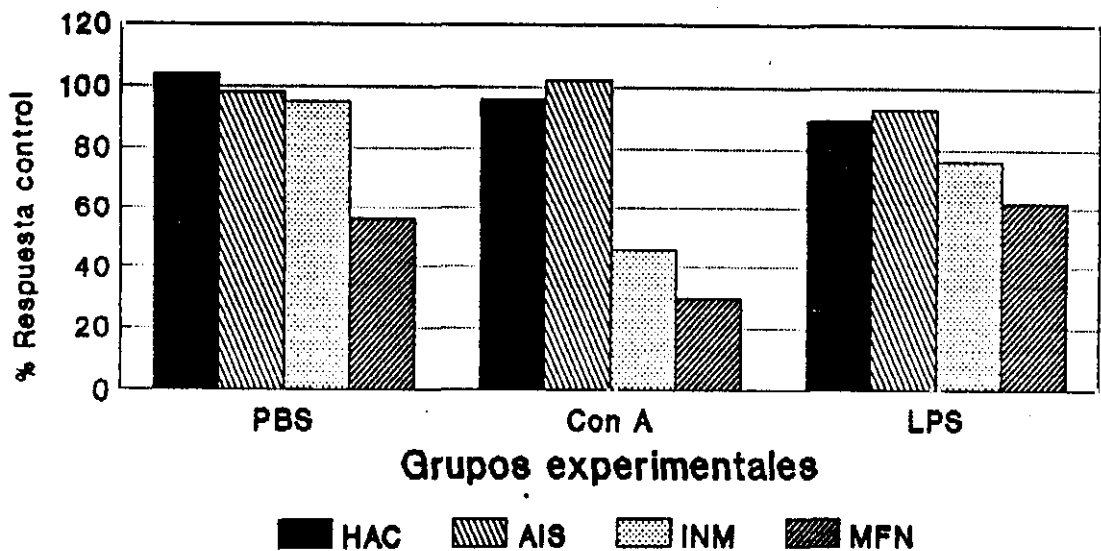


Fig. 27.-Número total de esplenocitos en ratones BALB/c sometidos a situaciones de estrés por AIS, HAC y INM durante una, dos o tres semanas.

En los esplenocitos obtenidos, se determinan las **respuestas blastogénicas** a los

30 minutos de finalizar las circunstancias que inducen el estrés; los datos se resumen en la Fig. 28, donde se comprueba que los modelos de hacinamiento y aislamiento - particularmente el último- no son tan efectivos para producir una situación de estrés que altere la respuesta inmunitaria. Los valores medios expresados en % respecto a respuesta control fueron: **Hacinamiento (HAC)**: PBS = 102%, ConA = 97,2%, LPS = 90,2% ($p = n.s.$); **Aislamiento (AIS)**: PBS = 99%, ConA = 102%, LPS = 92% ($p = n.s.$); **Inmovilización (INM)**: PBS = 97,2%, ConA = 45% ($p \leq 0,05$), LPS = 78% ($p \leq 0,05$); **Morfíndependencia (MFN)**: PBS = 57% ($p \leq 0,05$), ConA = 30% ($p \leq 0,01$), LPS = 61% ($p \leq 0,05$) (Fig. 28).



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto al control

Fig. 28.-Respuesta blastogénica en ratones BALB/c sometidos a cuatro modelos de estrés (AIS, HAC, INM y MFN) durante una semana. Se determina la blastogénesis intrínseca (PBS) e inducida (ConA y LPS) y se expresa como % respecto al control.

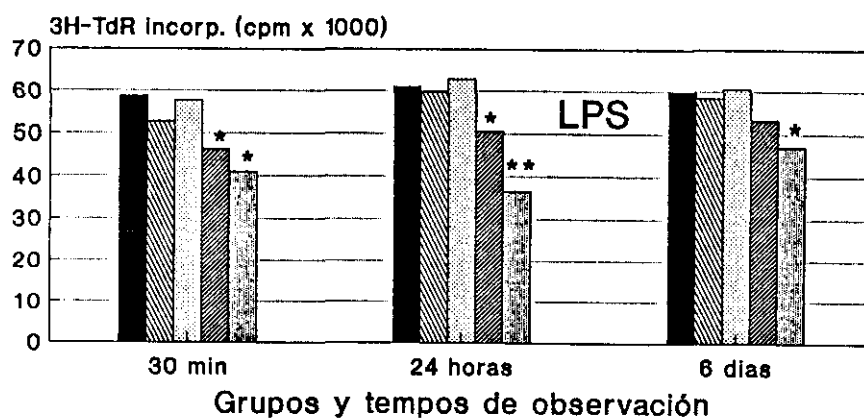
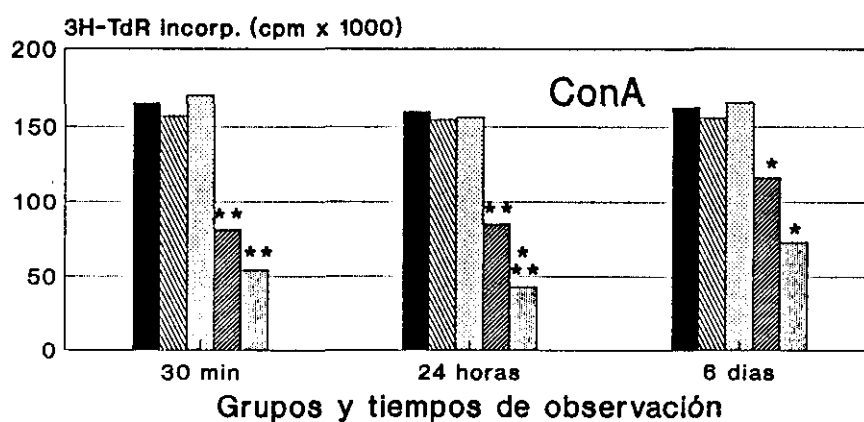
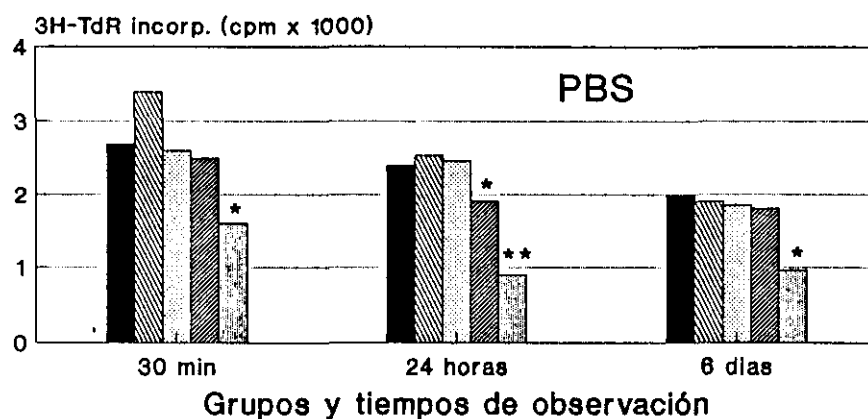
La respuesta blastogénica se estudia más detenidamente en función del tiempo y empleando ambos mitógenos: LPS (para linfocitos B), y Con-A (para linfocitos T). Como puede verse en la Fig. 29, donde se comparan los cuatro modelos, se produce, para el modelo de **inmovilización (INM)**, una disminución en la respuesta de mitogénesis intrínseca que alcanza su máximo a las 24 horas (21% de diferencia respecto al control) para recuperarse posteriormente a los 6 días. Esta inhibición en la proliferación es más acusada

cuando se usa ConA, y se presenta desde los primeros 30 minutos (ConA: 50%; LPS: 78%) tendiendo progresivamente hacia la normalización. El modelo de **morfino dependencia (MFN)** produce una depresión más marcada y de mayor duración, puesto que para todas las situaciones presenta su máximo a las 24 horas (PBS: 42%; ConA: 25%; LPS: 61%), y su efecto se mantiene a los seis días (PBS: 49%; ConA 48%; LPS 78%) (La significación estadística se detalla en la Fig. 29).

Las curvas obtenidas en función del tiempo para los parámetros que acabamos de analizar (PBS, LPS y ConA), se correlacionan con las variaciones de **corticosterona** en función del tiempo obtenidas previamente (Figs. 12 y 13).

Una vez más, en nuestras condiciones de trabajo, se comprueba que el estrés alcanzado en los grupos de hacinamiento y aislamiento, no es suficiente para producir elevaciones relevantes en el nivel de COR sérica, ni para inducir variaciones significativas en las respuestas blastogénicas, lo que los hace poco apropiados para nuestro propósito. Esto nos lleva a continuar el estudio utilizando únicamente los modelos de inmovilización y de morfino dependencia.

Se ha realizado un estudio más detallado de las modificaciones producidas por la inmovilización (Fig. 30) y la morfino dependencia (Figs. 31 a y b) en la respuesta de las células T, que habían demostrado ser las más afectadas. Para ello, se ha ensayado la influencia de la **concentración del mitógeno en el medio** (1 y 3 μg de Con A/pocillo, respectivamente), y se ha estudiado la respuesta de las células CD3⁺ frente al **antisuero monoespecífico 2C11** a las concentraciones de 0.5 y 1 μl /pocillo, respectivamente. Las situaciones de estrés se mantuvieron, en ambos modelos, durante una o dos semanas para estudiar las variaciones en función del tiempo de duración de dicho estrés. Al finalizar los tratamientos estresantes, se determinaron los niveles de corticosterona, como índice de la reacción de estrés del animal frente a la agresión y las respuestas blastogénicas, como índice de actividad del sistema inmune (Fig. 32).

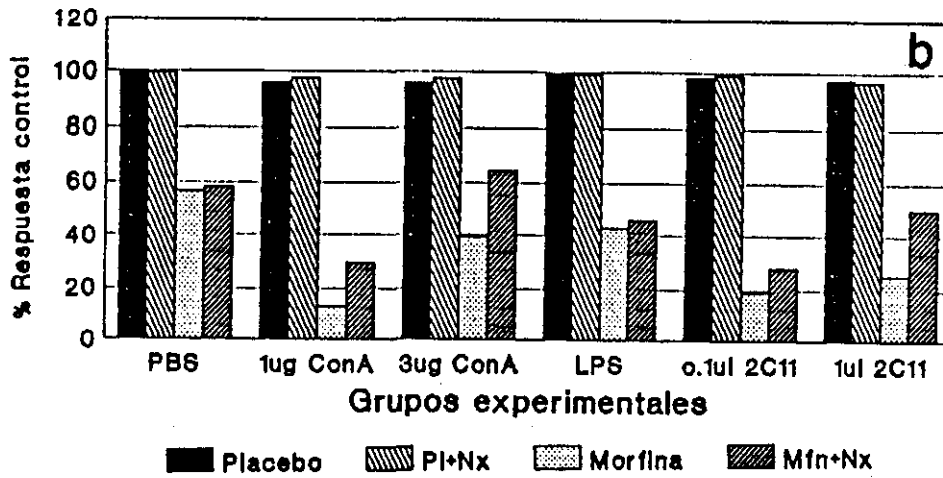
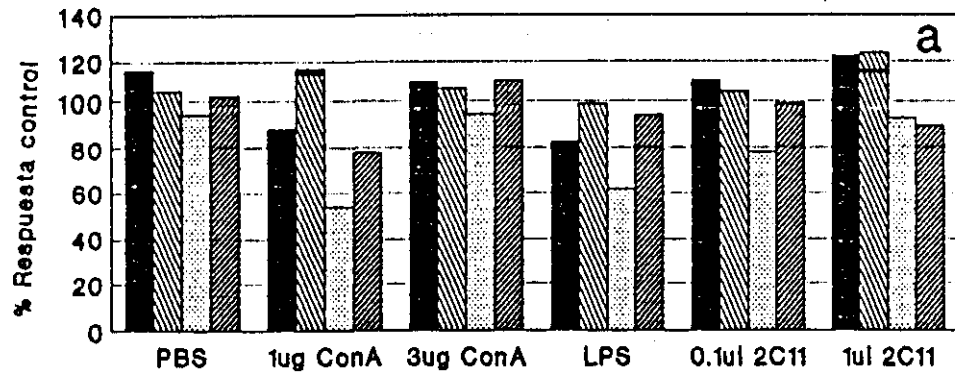


Grupo experimental

CTR HAC AIS INM MFN

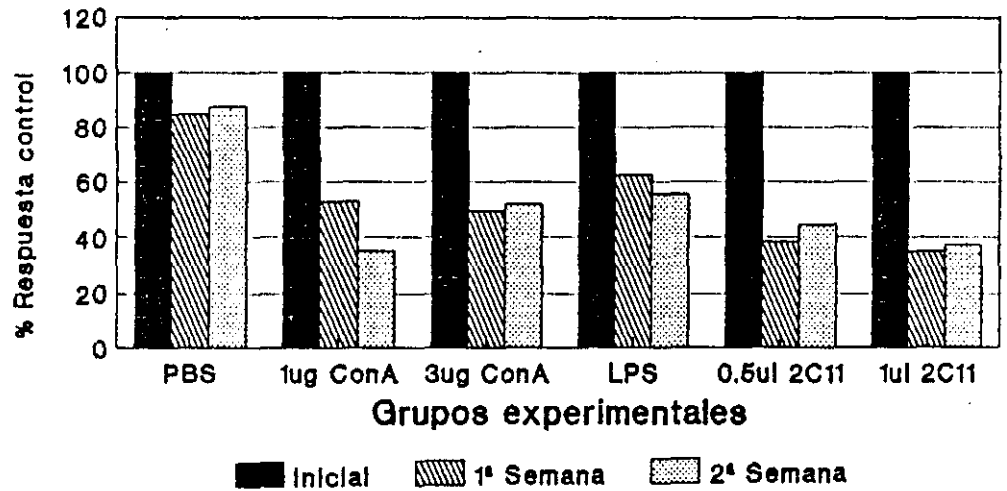
* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Fig. 29.-Blastogénesis (intrínseca e inducida) en ratones BALB/c sometidos a estrés por HAC, AIS, INM y MFN. Determinaciones realizadas a los 30 min., 24 h. y 6 días de finalizar la situación de estrés.



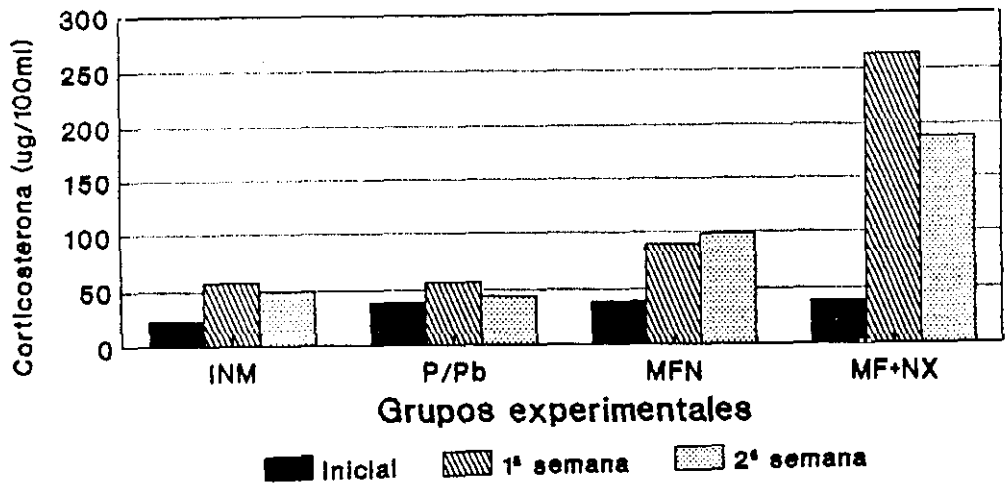
* $p < 0,05$ respecto control. ** $p < 0,01$ respecto al control.

Fig. 31.- Blastogénesis en esplenocitos de ratones BALB/c sometidos a estrés por morfíno-dependencia y en síndrome de abstinencia, durante una (a) y dos semanas (b). Determinaciones como en la figura anterior.



* p < 0,05 respecto control. ** p < 0,01 respecto al control.

Fig. 30.- Blastogénesis en esplenocitos de ratones sometidos a estrés por inmovilización. Se determina blastogénesis intrínseca e inducida por diferentes mitógenos (ConA y LPS) y antígenos (2C11) a diferentes concentraciones. Resultados expresados en % respecto control.



* p < 0,05 respecto control. ** p < 0,01 respecto al control.

Fig. 32.- Niveles de COR en ratones BALB/c sometidos a 1 ó 2 semanas de estrés. Incluye INM, MFN, síndrome de abstinencia (MF+Nx) y placebo (P/Pb).

Para el modelo de **inmovilización** (Fig. 30) se comprueba de nuevo una discreta depresión de la blastogénesis intrínseca con tendencia a revertir cuando se mantiene el modelo dos semanas (PBS 1ª semana: 84%, 2ª semana 87,3% respecto a la respuesta control, $p = n.s.$). La mitogénesis ConA inducida confirma una inhibición en la respuesta, que se mantiene la segunda semana, y en ésta revierte aumentando la dosis de mitógeno (En la 2ª semana: 1 μg de ConA 35,4%, 3 μg de ConA 51,8% respuesta respecto control; $p \leq 0,05$)

En el ensayo con antisuero monoespecífico 2C11 (frente a CD3+), se observa una depresión mayor durante la primera semana (para 0,5 μl : 38,2% y 44,5% de respuesta para la 1ª y 2ª semana; $p \leq 0,05$ frente al control) que no se corrige al incrementar la dosis de 2C11 (1 μl : 35,2% y 38,4% de respuesta para la 1ª y 2ª semana $p \leq 0,05$ respecto al control).

Para las células LPS sensibles (linfocitos B), se produce una depresión que aumenta al mantener el estrés durante dos semanas (1ª sem.: 63,2%; 2ª sem.: 55,2%). Por tanto, podemos afirmar que los ensayos referentes a PBS, ConA (3 μg) y 2C11 siguen el patrón que cabría esperar una vez conocidos los niveles de corticosterona (Fig. 32).

En cuanto a los cuadros de estrés por **morfino-dependencia**, en el modelo de una semana (Fig. 31 a), se produce una depresión significativa de la proliferación celular, especialmente a nivel de linfocitos T (1 μg ConA: 53,8%, 2C11: 78,3% de respuesta) y que desaparece al aumentar la dosis de mitógenos (3 μg ConA: 95,4%; 1 μl 2C11: 93,6%; $p = n.s.$ frente al control). La respuesta a LPS se encuentra algo más deprimida que en el modelo de INM para el mismo tiempo (LPS: 61,7% de respuesta respecto a control).

En la segunda semana de adición (Fig. 31 b) se observa una depresión todavía mayor que sigue siendo más marcada para linfocitos T, y que solo se corrige parcialmente al elevar la dosis de mitógenos (1 μg ConA: 13%, $p \leq 0,01$; 3 μg ConA: 39%; 0,5 μl 2C11: 19%; 1 μl 2C11: 25% respuestas respecto al control). Para células LPS sensibles, también

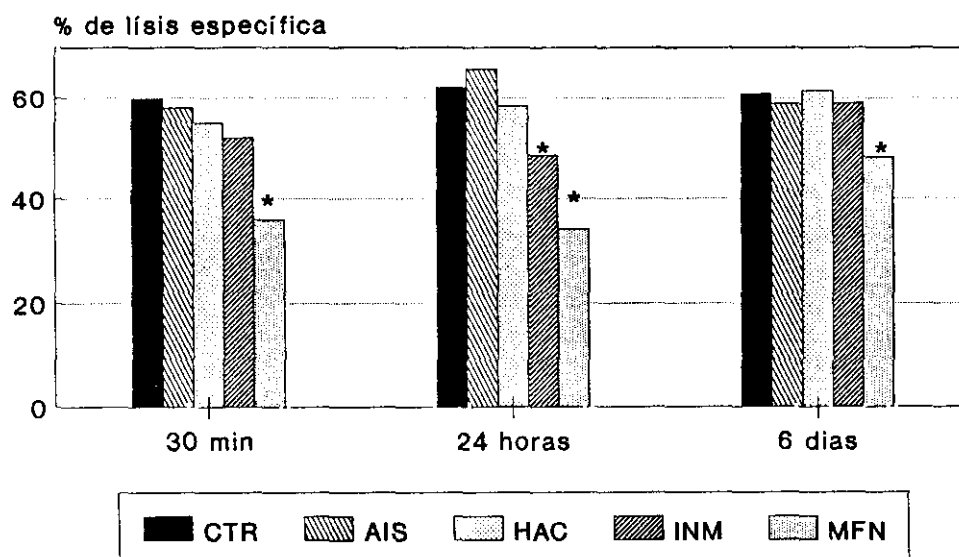
se produce una inhibición más acusada (LPS 1ª sem.: 61,7%; 2ª sem.: 41%). La mitogénesis intrínseca, que no expresaba alteraciones durante la 1ª semana, se afecta en la segunda (94,6% y 56,6% respectivamente).

La colocación de un "*pellet*" **placebo** con lactosa, conlleva alteraciones moderadas, con gran variabilidad individual (no significativas), que desaparecen en la segunda semana, y que están en relación con el estrés quirúrgico que supone el método.

La provocación de un **síndrome de abstinencia**, mediante la administración parenteral de naloxona (Nx), asocia una inmunorrestauración variable según los parámetros considerados para los dos modelos temporales (Fig. 31 a y b). Así, se obtuvieron cambios significativos en la mitogénesis inducida por 1 µg de ConA (en 1ª y 2ª Semanas); mitogénesis en presencia de 2C11 (0,1 µl, en la 1ª Semana; y 1 µl en la segunda); y mitogénesis LPS-inducida. El uso de este fármaco (Nx) en los grupos controles placebo, asocia en general discretísimas variaciones en el modelo de una semana, y ninguna variación en el de dos semanas.

Este estudio a nivel de proliferación linfocitaria se completa con la determinación de las variaciones en la capacidad de **síntesis de IL-2** mostrada por las células T obtenidas del bazo de ratones sometidos a distintos tipos de estrés durante una semana. En la Fig. 33 se puede ver que apenas se produce inhibición en la síntesis de IL-2 para los grupos que padecen una situación de aislamiento o hacinamiento; sobre todo en el primero de los casos, mientras que en los grupos sometidos a inmovilización sí se observan variaciones significativas, que son más intensas en los cuadros de estrés por morfíndependencia. En ambos casos la depresión es mayor a las 24 horas, y tiende a normalizarse a los seis días (INM 24 h.: 76%, MFN 24 h.: 54% respecto al control; $p \leq 0,05$).

En este estudio de las variaciones de respuestas linfoproliferativas, producidas durante las situaciones de estrés, existe un caso particular dentro de los grupos de inmovilización, y a ello hicimos referencia al principio. Este es el caso de aquellos animales



* $p < 0,05$ frente a grupo control

Fig. 33.-Síntesis de IL-2 tras someter a ratones BALB/c a situaciones de estrés por AIS, HAC, INM y MFN. Variaciones expresadas en % de lisis específica.

a los que se daba oportunidad de **autoliberación** y en los que se observa una estimulación de la respuesta blastogénica intrínseca en presencia de PBS, y también, en las mitogeno-inducidas por 1 ug de Con A, pese a tener un nivel sérico de corticosterona más elevado que en condiciones normales; sin embargo las variaciones en células LPS-sensibles eran semejantes a las observadas en los grupos inmovilizados y sin posibilidades de autoliberación (Fig. 34). Sin embargo, los resultados presentan una cierta depresión con gran variabilidad individual, posiblemente esto se deba a la dificultad de normalizar el modelo en cuanto al tiempo final de inmovilización.

En relación con las modificaciones a nivel de respuestas de citotoxicidad natural, se observa una disminución en la **actividad de células NK** de origen esplénico procedentes de ratones sometidos a una situación de estrés por inmovilización; y también, en los casos de morfinodependencia con desarrollo o no de un síndrome de abstinencia. En la Fig. 35 se establece un examen comparativo de ambas situaciones en función de los tiempos de observación. Así se comprueba que el estrés por inmovilización tiene menos efecto sobre las respuestas de citotoxicidad natural (INM 1ª sem.: 49% de lisis específica, 2ª sem.: 44%

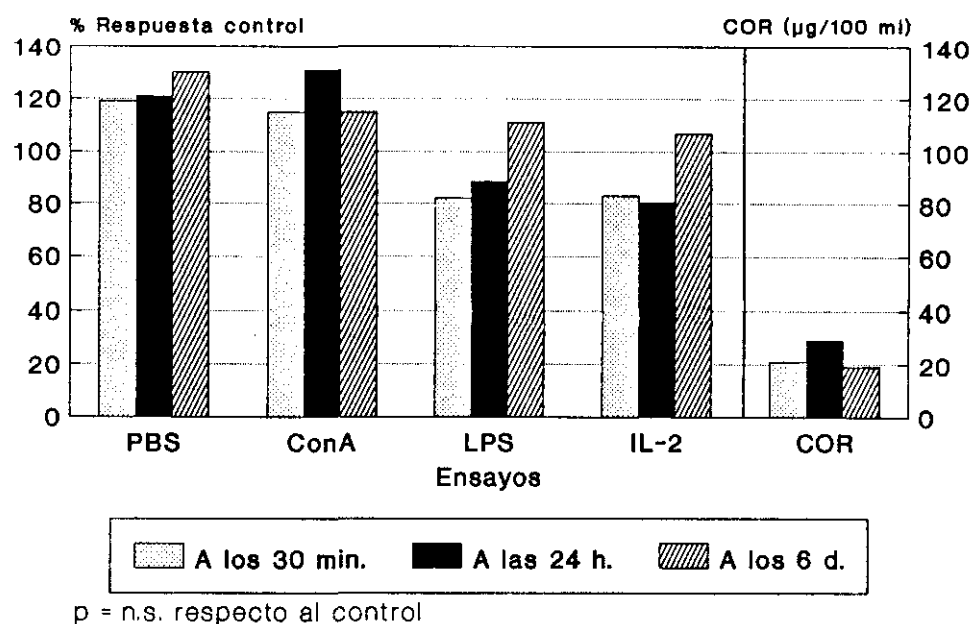
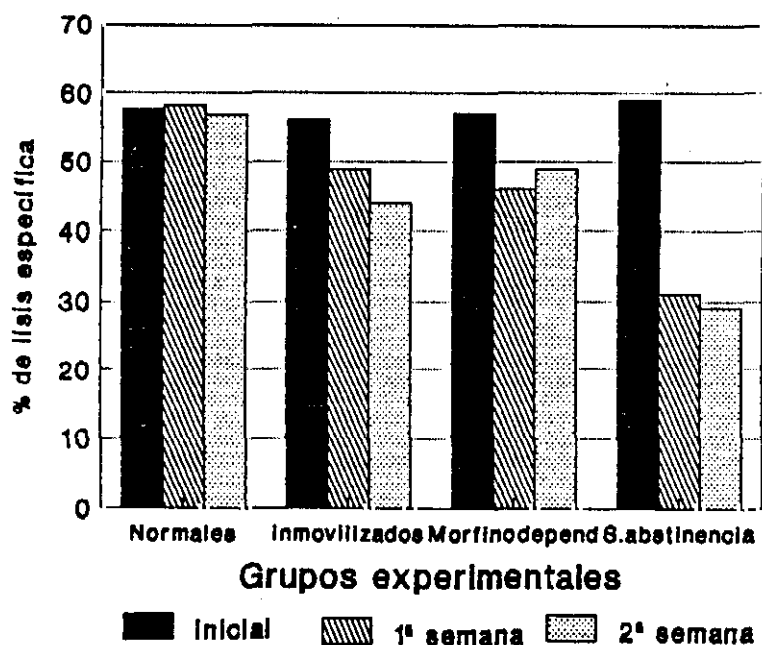


Fig. 34.-Variaciones en respuestas linfoproliferativas y niveles de COR en ratones BALB/c inmovilizados, pero con posibilidad de autoliberación.

$p \leq 0,05$ respecto al control) que en las situaciones de morfina dependencia (MFN 1^a sem.: 46% y 2^a sem.: 49% de lisis específica; $p \leq 0,05$ respecto al control). Esta inhibición se acrecienta aún más cuando se desencadena un síndrome de abstinencia por administración parenteral de naloxona 30 minutos antes de valorar la lisis específica frente a células YAC-1 (1^a sem.: 31%; 2^a sem.: 29% de lisis específica).

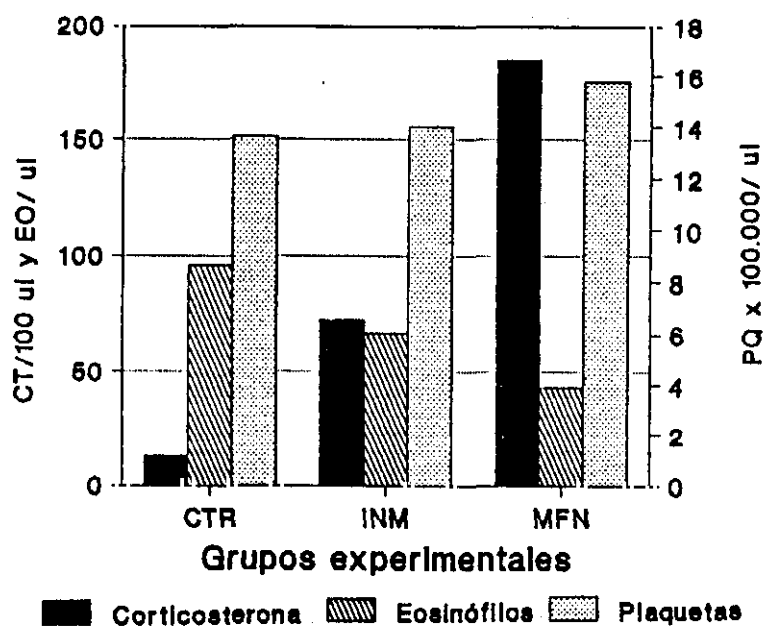
En los otros casos de estrés menos efectivo, por aislamiento y hacinamiento, e incluso en casos de inmovilización con posibilidades de autoliberarse, no se observaron variaciones significativas a nivel de actividad citotóxica en las células NK esplénicas de origen murino (Figs. 25 y 35).

Los datos resumidos en la figura 36, recogen los recuentos de **eosinófilos** y **plaquetas**, en situaciones de estrés por inmovilización y morfina dependencia, sin que existan fenómenos de hipersensibilización. Reflejan disminución en el número de EOS (que es significativa para el caso de la MFN) y apenas se aprecia algún cambio significativo en el número de plaquetas, en relación con niveles de COR, elevados en ambos modelos.



* $p < 0,05$ respecto al control. ** $p < 0,01$ respecto al control.

Fig. 35.-Variaciones de actividad de células NK obtenidas de ratones BALB/c sometidos a INM y MFN durante 1 ó 2 semanas, y expresada en % de lisis específica.



* $p < 0,05$ respecto al control. ** $p < 0,01$ respecto al control.

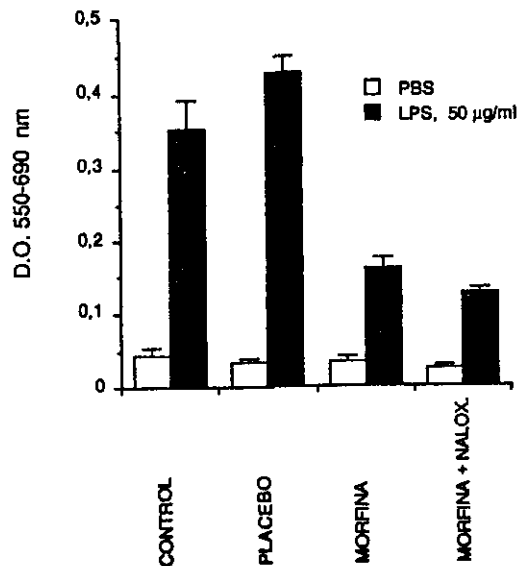
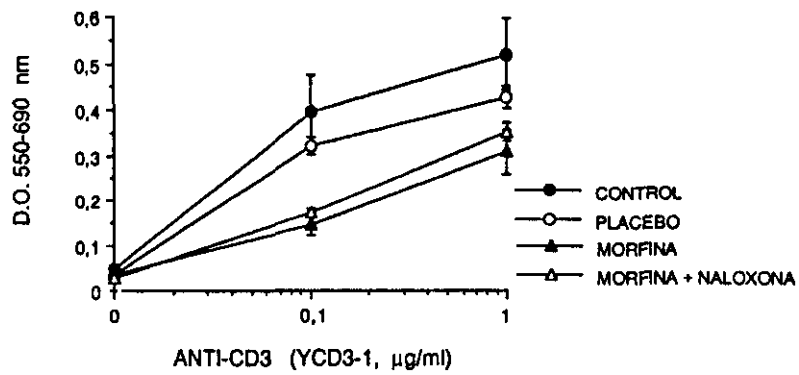
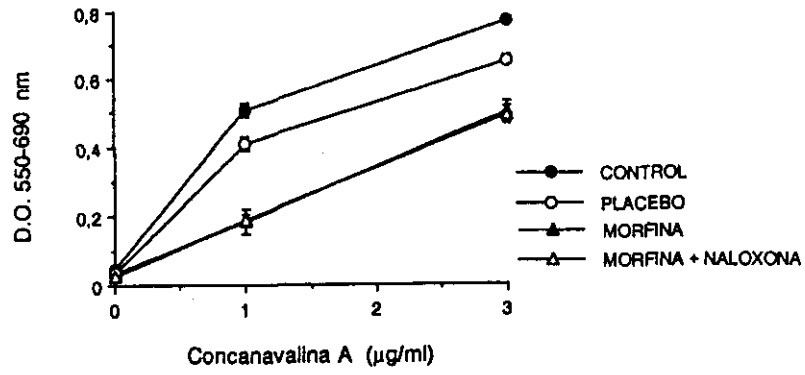
Fig. 36.-Niveles de COR, número de eosinófilos (EOS) y plaquetas (PLQ) en ratones BALB/c sometidos a estrés por INM y MFN.

Ante la clara evidencia de una situación de inmunodepresión coincidente con los cuadros de estrés de MFN e INM, hemos querido profundizar en el conocimiento de la función linfocitaria. Para ello se han estudiado los cambios en la **expresión funcional de las moléculas de superficie** de las células inmunocompetentes, confirmando previamente por ensayos de proliferación celular en placa, según el método colorimétrico de Mossman, la inmunodepresión existente.

El estudio se lleva a cabo en grupos de cinco a ocho ratones BALB/c de ocho semanas de edad, sometidos a situaciones de estrés por inmovilización, y por morfina dependencia, del mismo modo que se realizó en los ensayos previos para determinar niveles de corticosterona, y respuestas linfoproliferativas.

En todos los grupos experimentales se comprobó previamente, la situación de estrés por el nivel de COR sérica, y también el estado de depresión sobre la respuesta linfoproliferativa, tal como se observa en los ejemplos de respuesta condicionada por morfina dependencia que se resumen en las Figs. 37, 38 y 39 frente a ConA y suero anti-CD3 (para células T) y frente a LPS (para células B), respectivamente.

La expresión de distintos marcadores de superficie en los linfocitos, nos permite estudiar la funcionalidad de las distintas subpoblaciones linfocitarias. El estudio se realizó formando un "pool" a partir de suspensiones celulares obtenidas del bazo de cada ratón, determinando el número de **células B (Ig⁺)**, mediante anticuerpos anti-Ig de rata FITC-marcado en presencia de 10% de suero normal de rata (para bloquear la unión inespecífica). En el caso de los **linfocitos T**, se utilizaron los marcadores **CD4⁺ y CD8⁺**, realizando una tinción -con anticuerpos de rata frente a las moléculas específicas- en dos fases, incubando primero las células en concentraciones apropiadas de los correspondientes anticuerpos monoclonales biotinilados y después con anticuerpos anti-biotina FITC-marcados, añadiendo el correspondiente 10% de suero de ratón.



Figs. 37, 38 y 39.-Inmunodepresión en ratones BALB/c sometidos a morfinedependencia y síndrome de abstinencia (se incluye placebo y control). Determinaciones con distintas concentraciones de ConA (Fig. 36); de anti-CD3 (Fig 37); LPS (50 µg/ml) y PBS. Se determina la proliferación por método de D.O. 540 nm.

Los resultados obtenidos con diferentes grupos de ratones sometidos a **inmovilización** no revelaron cambios significativos en la funcionalidad de las distintas subpoblaciones; tan sólo se apreció un descenso muy ligero en el número total de células inmunocompetentes/bazo que podría tener escasa significación si se relaciona con el acusado efecto de inmunodepresión observado en estos casos. Estos datos justifican la no inclusión de figuras relativas a estos experimentos.

Cuando estudiamos los animales sometidos a **morfino dependencia**, se observan algunos cambios en los marcadores funcionales de las distintas subpoblaciones linfocitarias, tal como se resume en las Figs. 40, 41, 42 y 43. En estas figuras se comparan los perfiles de citometría de flujo obtenidos para los grupos control, placebo y morfino dependiente, de acuerdo con las diferentes tinciones específicas de cada grupo celular: células B (Fig. 40), células T (Fig. 41), células CD4⁺ (Fig. 42) y células CD8⁺ (Fig. 43), comparándolas con los obtenidos frente a una tinción negativa. Para su mejor comparación, recurrimos a tabular los distintos porcentajes de células en cada caso y grupo experimental, indicando los anticuerpos utilizados en la tinción específica de cada grupo celular (Tabla VIII).

Los datos antes reseñados no sufrieron apenas modificación al desencadenar un síndrome de abstinencia mediante la inyección de naloxona dos horas antes de extraer las células; lo que provoca una extraordinaria elevación de los niveles séricos de COR.

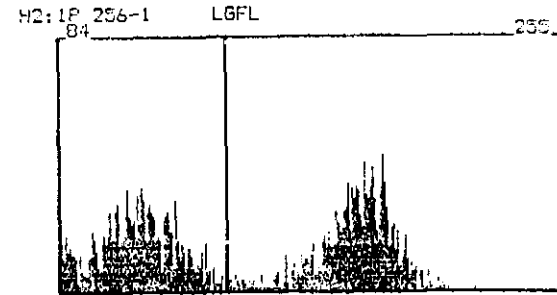
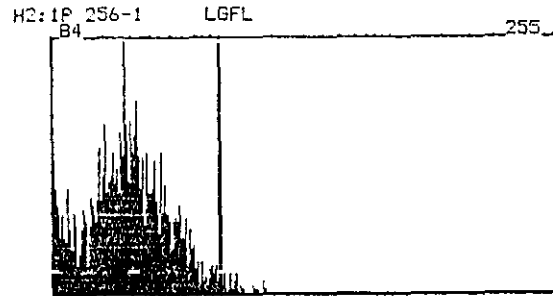
En la Tabla IX se resumen los datos relativos a la expresión de marcadores funcionales de subpoblaciones linfocitarias del bazo, número total de esplenocitos, peso del hígado y peso corporal, para tener una idea de conjunto de las variaciones en la dinámica funcional de las células esplénicas de ratones BALB/c sometidos a estrés por morfino dependencia.

GRUPOS
EXPERIMENTALES

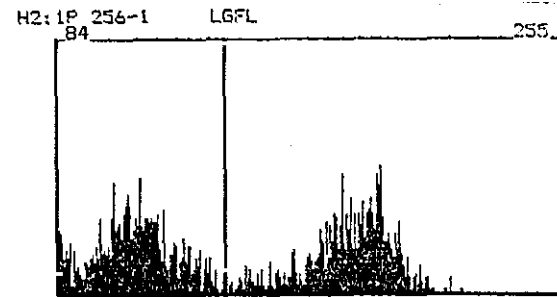
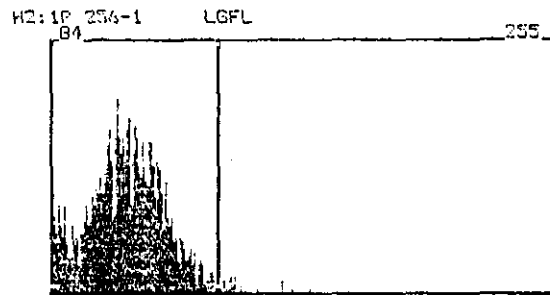
Tinción negativa
- / Cabra anti-Biotina-FITC

Células B
- / Cabra anti-Ig de ratón-FITC

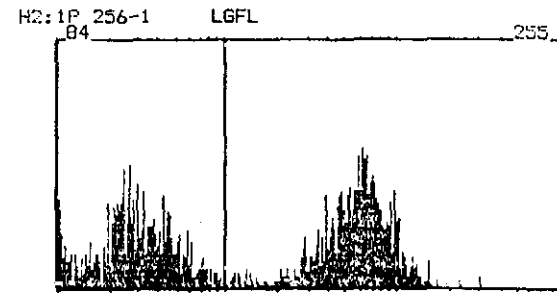
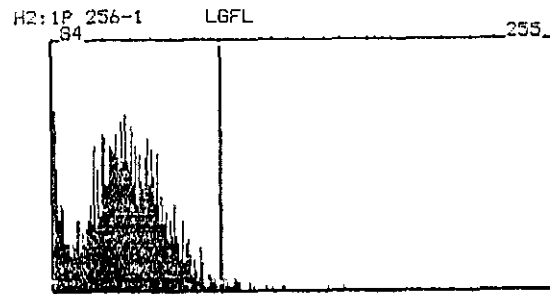
CONTROL



PLACEBO



MORFINA

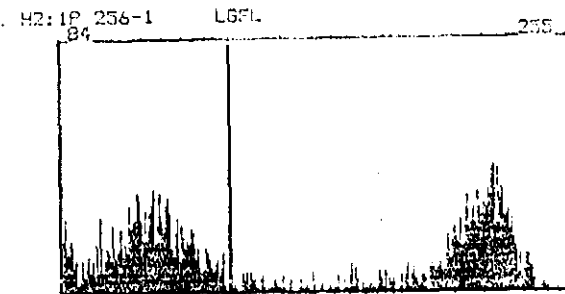
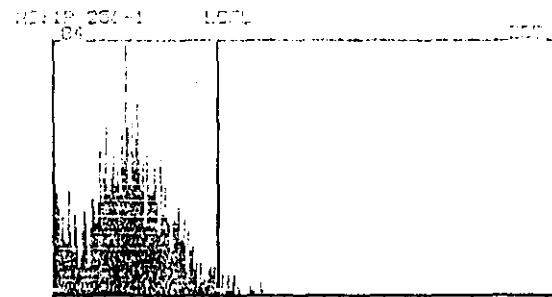


GRUPOS
EXPERIMENTALES

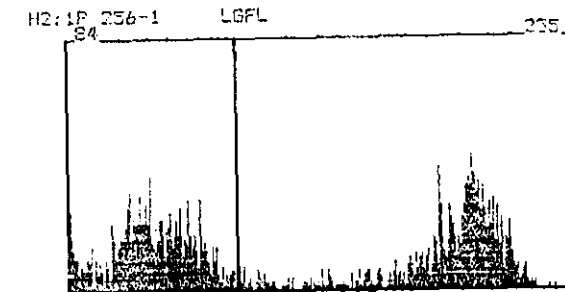
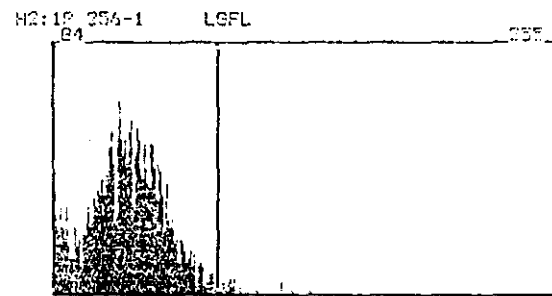
Tinción negativa
- / Cabra anti-Biotina-FITC

Células T
Y-19-biotina / Cabra anti-biotina-FITC

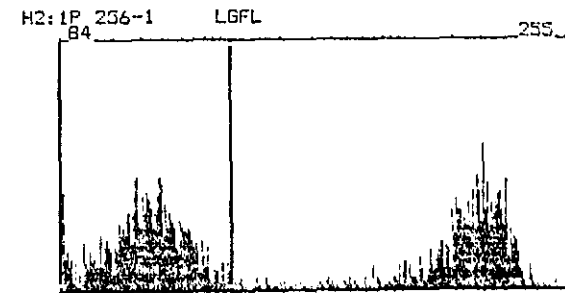
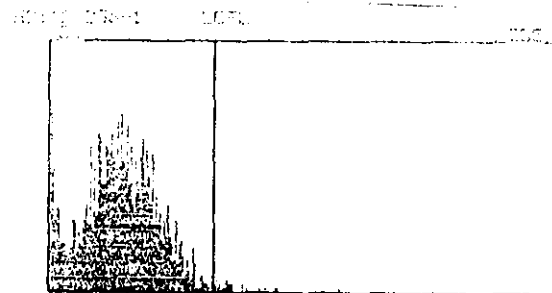
CONTROL



PLACEBO



MORFINA

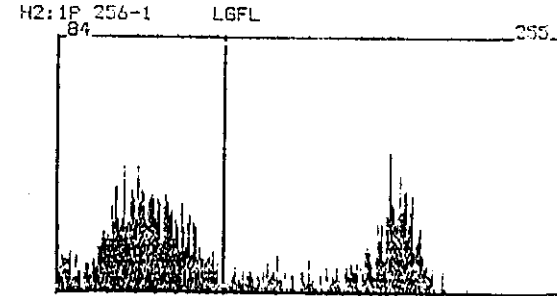
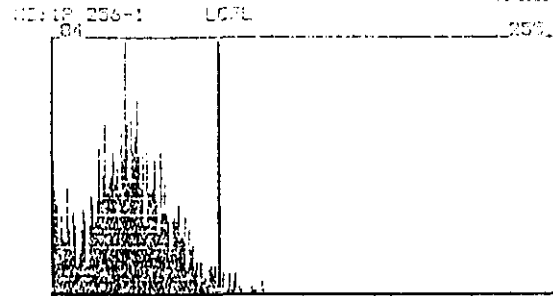


GRUPOS
EXPERIMENTALES

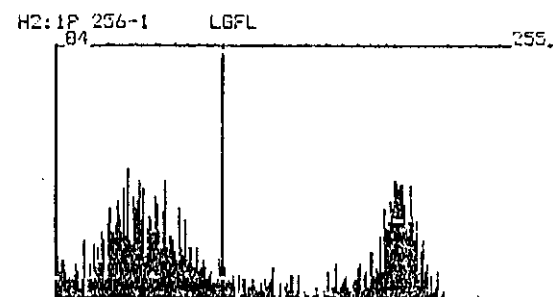
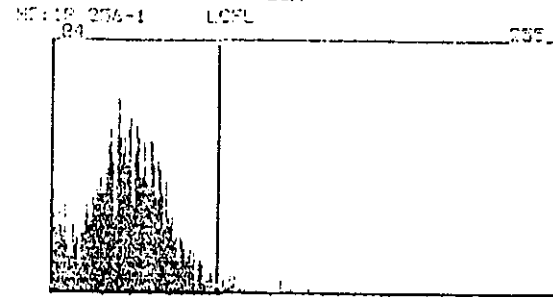
Tinción negativa
- / Cabra anti-Biotina-FITC

Células T CD4⁺
GK1.5-biotina / Cabra anti-biotina-FITC

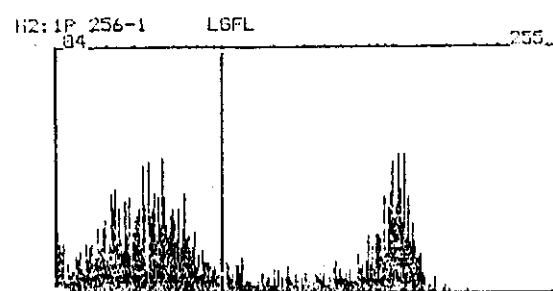
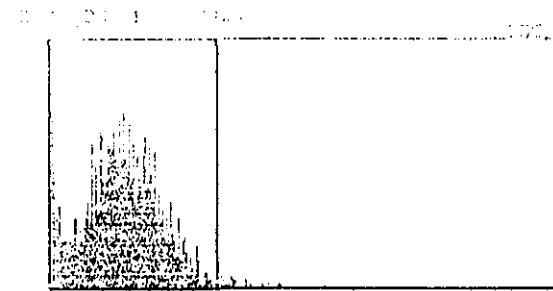
CONTROL



PLACEBO



MORFINA

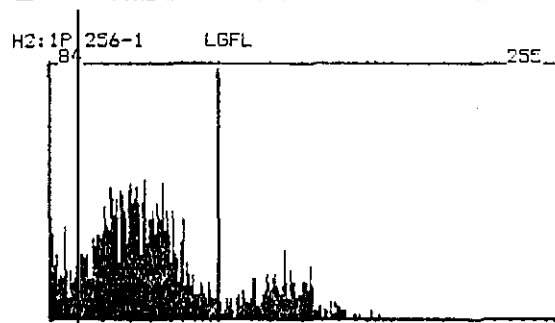
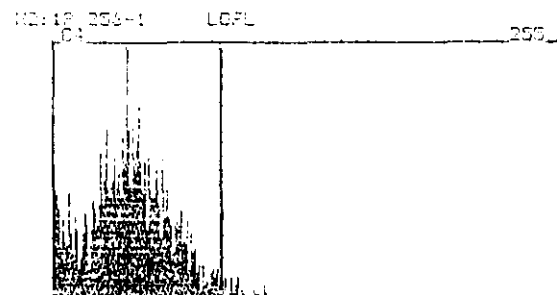


GRUPOS
EXPERIMENTALES

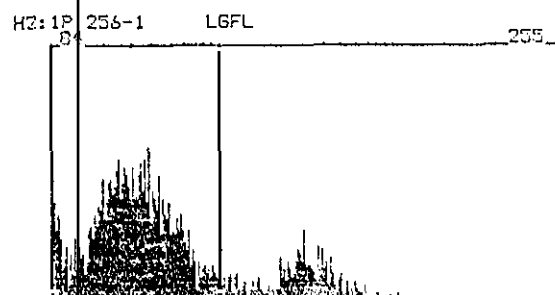
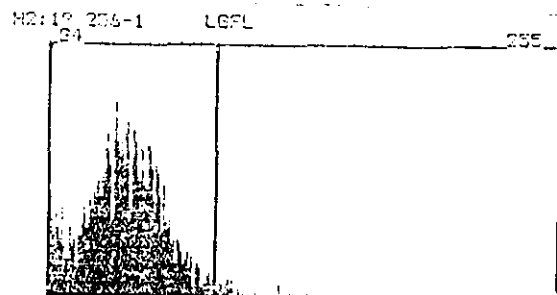
Tinción negativa
- / Cabra anti-Biotina-FITC

Células T CD8⁺
53-6.72-biotina / Cabra anti-biotina-FITC

CONTROL



PLACEBO



MORFINA

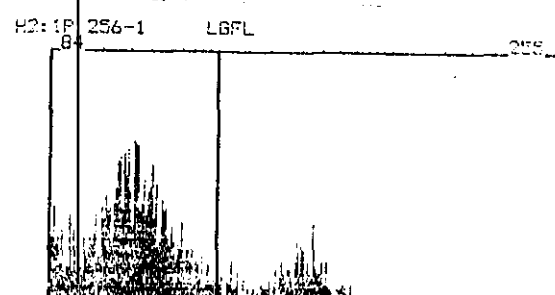
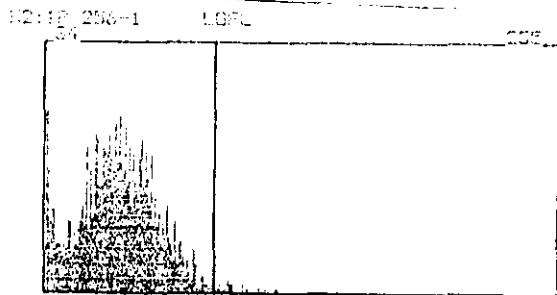


TABLA VIII .-Variaciones en la expresión funcional de subpoblaciones linfocitarias en ratones BALB/c en situación de morfino-dependencia experimental, comparados con grupos placebo y control (Expresado en %).

Tipos de células y tinción	GRUPOS EXPERIMENTALES		
	Control	Placebo	Morfina
Tinción negativa -/Gα Biot.	1,36	1,49	1,29
Células B mIg+ -/Gα mouse FITC	45,94	44,04	48,62
Cél.T totales 4-19.b/Gα Biot.FITC	43,39	44,9	41,32
Células CD 4+ GK1.5.b/Gα Biot.FITC	34,19	35,78	35,79
Células CD 8+ TiB105.b/GαBiot.FITC	16,09	15,01	15,28

IV.2.2- Variaciones de las respuestas anafilácticas en situaciones de estrés

Para estudiar los cambios que el estrés produce en las situaciones de anafilaxia, se sensibiliza a los animales, según el modelo establecido previamente, y se inducen situaciones de estrés, midiendo después las variaciones en la respuesta cuando se desencadena la reacción anafiláctica. El uso de este sistema nos permite estudiar de qué modo se modifica la respuesta inmune *"in vivo"* en situaciones de estrés.

Como hemos explicado anteriormente, y a la vista de los resultados obtenidos en el estudio preliminar de los modelos, hemos seleccionado dos tipos de reacciones de anafilaxia pasiva: una a nivel sistémico de carácter generalizado (PSA) y otra a nivel cutáneo (PCA); empleando para la primera un antígeno endotóxico (EDTX) frente a un suero heterólogo de conejo, y para la segunda un antígeno protéico (BSA) frente a un suero homólogo de ratón.

Tabla IX

Efecto de la implantación de un pellet de morfina sobre el peso corporal, peso del hígado y parámetros de células linfoides en ratones BALB/c

Tratamiento	Peso corporal ^a			Células de bazo				
	Día 0	Día 4	Peso del hígado ^a	Células/bazo ^b	% B (Ig ⁺) ^c	% CD3 ⁺ ^c	% CD4 ⁺ ^c	% CD8 ⁺ ^c
Ninguno	28.75 ±0.47	29.75 ±0.73	1.720 ±0.106	102.50 ±3.42	45.9(147)	43.3(135)	33.0(156)	12.6(115)
Pellet Control	26.84 ±1.07	27.28 ±0.72	1.482 ±0.064	110.51 ±8.13	44.0(146)	44.9(136)	34.8(157)	12.1(122)
Pellet de Morfina	28.21 ±0.88	28.22 ±1.40	1.512 ±0.037	<u>60.37 ±9.32^d</u>	48.6(149)	44.3(137)	34.5(153)	12.0(121)

^aPeso medio (en gr) de 8 ratones por grupo experimental ± E.E. No se observan diferencias significativas.

^bCélulas x10⁻⁶/bazo. Media de 8 ratones ± E.E.. Las diferencias significativas se indican subrayadas.

^cPorcentajes de población positiva en mezcla de células de bazo de 8 ratones. La intensidad de fluorescencia para cada subpoblación se indica entre paréntesis.

^dDiferencias significativas entre morfino-dependientes y no tratados o pellet control.

Inicialmente, se realizaron estudios del funcionamiento de ambos modelos en animal completo, utilizando como parámetros la determinación de la mortalidad, y del TL_{50} para PSA, y del tamaño de la lesión cutánea para PCA; posteriormente se determinaron los parámetros celulares para completar el estudio.

IV.2.2.1.- Reacción PSA anti-endotoxina.

Se establecieron dos variantes experimentales:

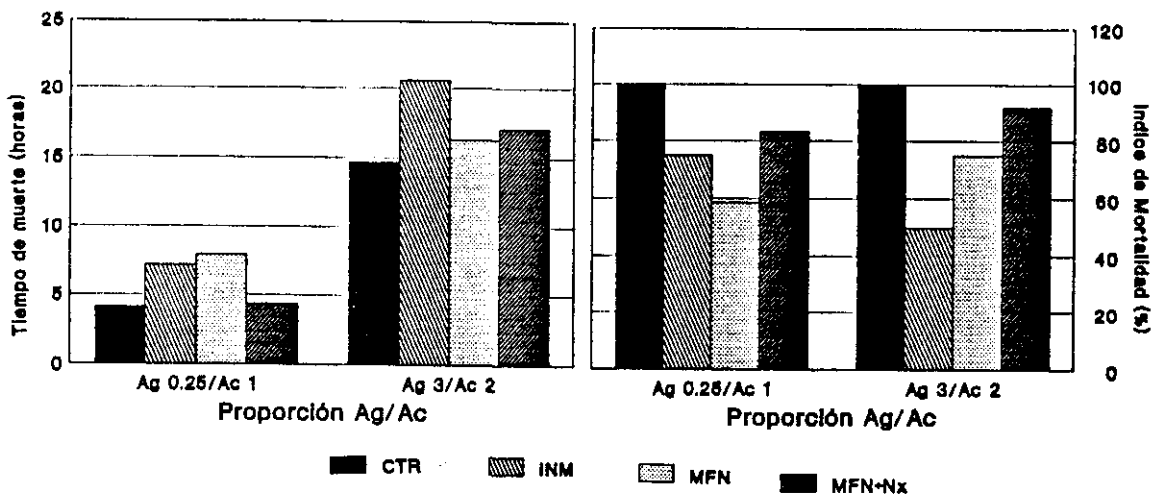
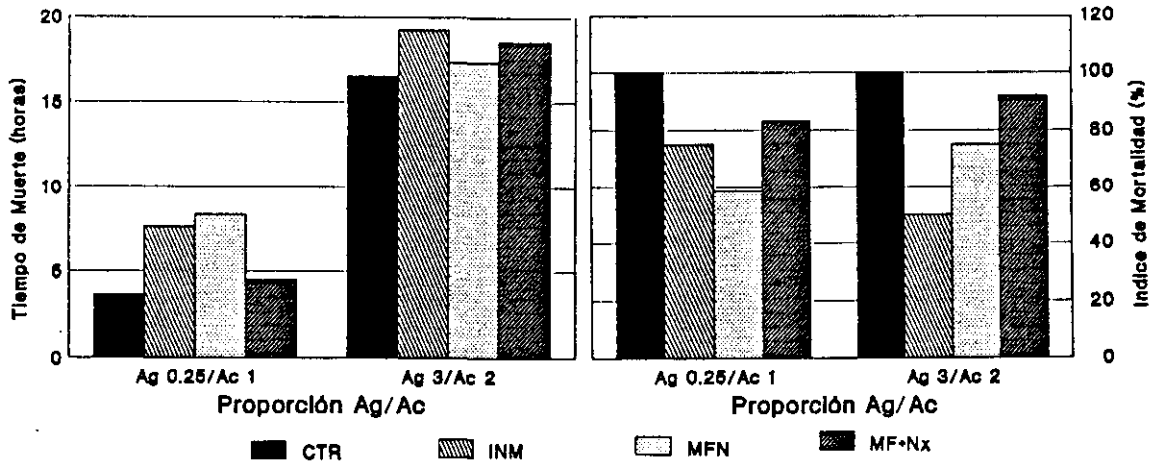
A,-En primer lugar sensibilizamos con un suero heterólogo distintos grupos de 12 ratones cada uno, y para ello utilizamos 0,15 ml/ratón de suero de conejo anti-endotoxina. A las 3 horas se inicia la situación de estrés correspondiente, por inmovilización o por morfina dependencia, durante una semana; al cabo de este tiempo se desencadena la reacción anafiláctica inyectando 0,15 ml de la solución antigénica de endotoxina de *Brucella* a la concentración que corresponda, de acuerdo con la relación Ag/Ac fijada previamente según datos de la curva de precipitación específica correspondiente (Fig. 14). En uno de los casos se inyectan 125 μ g de endotoxina en los 0,15 ml de PBS (Ag 3/Ac 2) para producir inmunocomplejos (IC) de pequeño tamaño, mientras que en otros casos se inyectaron 75 μ g (Ag 0,25/Ac 1), en cuya proporción se forman IC de mayor tamaño.

Para ambas proporciones de Ag/Ac, se observa una prolongación del TL_{50} en el modelo **inmovilización** (Fig. 44 a y b). Llama la atención, que en el caso de inmunocomplejos de gran tamaño (Ag 0,25/Ac 1), existe una proongación muy importante del tiempo de muerte (que pasa de 3,7 a 7,6 horas; $p \leq 0,05$), con una disminución del % de mortalidad. Sin embargo, para la proporción Ag 3/Ac 1, el alargamiento del TL_{50} es menor (el valor medio pasa de 16,5 a 19,2 horas; $p = n.s.$), mientras que disminuye drásticamente la mortalidad (en un 50%). Esta disminución en la agresividad del shock anafiláctico, refleja una menor actividad del sistema inmunitario en respuesta al estrés producido por la INM.

En el modelo de **morfinodependencia**, se produce una protección mayor para la proporción Ag 0,25/Ac 1, con TL₅₀ de más del doble de los controles (valores medios 8,3 h. y 13,7 h. respectivamente; $p \leq 0,05$), y una disminución del índice de mortalidad hasta un 58,3%. Cuando se provoca un **síndrome de abstinencia**, administrando naloxona, el efecto protector disminuye (TL₅₀: 4,5 horas, $p \leq 0,05$ respecto a MFN; y mortalidad: 83,3%). Si existe exceso de Ag, el grado de protección es mucho menor, tal como se refleja en ambos parámetros: el TL₅₀ pasa de 16,5 a 19,3 horas (valores medios), y la mortalidad baja al 73%. Al inyectar naloxona, aumenta el efecto protector, por una mayor depresión del sistema inmune, que para este caso es de un TL₅₀: 18,5 horas, y una mortalidad 91,6% (Fig. 44 a,b).

Los diferentes resultados para las dos proporciones Ag/Ac pueden ser explicados por diferencias fisiopatológicas en la lesión inmunitaria, en la que puede o no intervenir el sistema Complemento, como se discutirá posteriormente.

B.-En la otra secuencia temporal, se somete a los animales a las situaciones de estrés previamente indicadas durante el mismo tiempo. Después se procede a la sensibilización de los animales, y se desencadena la reacción anafiláctica con el antígeno endotóxico a las 6 h de la hipersensibilización. En este caso, se observó un perfil similar, aunque con algunas variaciones de tipo cuantitativo en los resultados. Así en la Fig. 45 a,b es posible comprobar que para el caso de **inmovilización** en el modelo de exceso de anticuerpo, se produjo una inhibición algo menor que en el caso anterior (TL₅₀ pasa de 4.1 a 7.2, $p \leq 0,05$; y la mortalidad baja al 83,3%). Sin embargo, cuando antígeno y anticuerpo están en la relación 3/2, las variaciones adquirieron mayor significación que en la anterior secuencia temporal (Fig. 44 a,b), pasando el TL₅₀ de 14,7 a 20,6 horas ($p \leq 0,05$), y bajando la mortalidad a 41,6%. La **morfinodependencia** (con o sin Nx) provocó, en las condiciones de este modelo, variaciones del TL₅₀ y % de M similares a las obtenidas en el caso de sensibilización previa al estrés, aunque con valores discretamente menores.



* p < 0,05 respecto al control. ** p < 0,01 respecto al control.

Figs. 44 y 45.-Variaciones producidas por el estrés en reacciones PSA en ratones BALB/c. Se emplean dos secuencias temporales: ratón sensibilizado sometido a estrés (44 arriba), y ratón estresado sometido a PSA (45). Se determinan TL₅₀ y % de mortalidad, para dos proporciones Ag/Ac.

Al comparar las distintas situaciones, vemos que en todos los casos de estrés hay inhibición de la reacción anafiláctica, que se manifiesta tanto en una prolongación del tiempo medio de muerte (TL_{50}) como en una disminución del índice de mortalidad.

IV.2.2.2.- Reacciones PCA con suero homólogo.

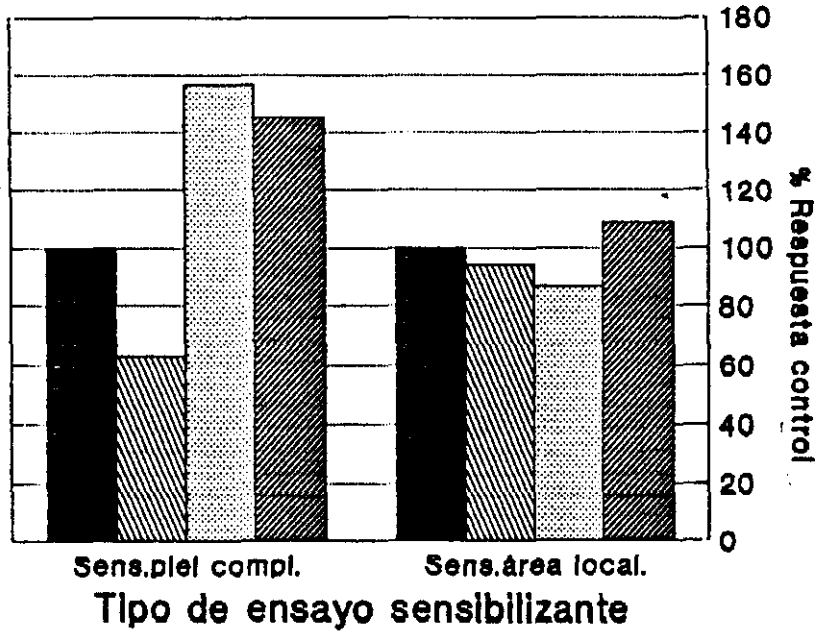
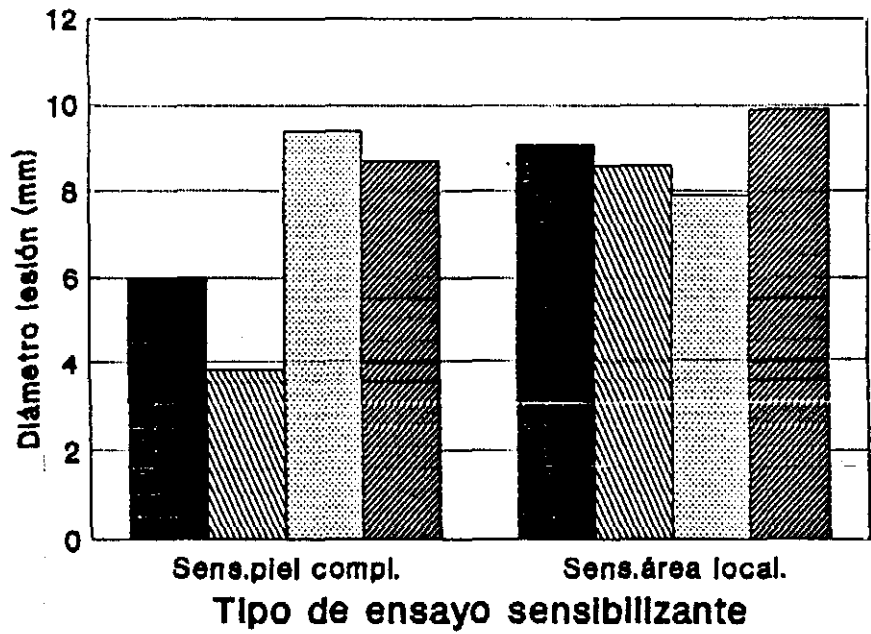
En el estudio previo realizado con la **reacción PCA revertida** (ver Fig. 20) para comprobar la sensibilidad de la reacción, observamos que el suero heterólogo precisaba de una mayor concentración para producir una intradermorreacción débil, posiblemente por la gran complejidad del antígeno inoculado o por diferencias en la capacidad de fijación dérmica de sus anticuerpos; y también, que en situaciones análogas, las reacciones frente a suero homólogo de ratón presentan una mayor sensibilidad en la respuesta.

Por este motivo, seleccionamos el modelo de PCA con suero homólogo para proseguir el estudio. En consecuencia, utilizamos los dos tipos de reacción indicados en el apartado de Métodos: a) sensibilización de toda la piel; y b) sensibilización sobre áreas localizadas. Los resultados, expresados en función de las dimensiones medias de las áreas de lesión y en % respecto del control, se resumen en las Fig. 46 a,b.

Los datos obtenidos demuestran que las lesiones dérmicas, probablemente por la alteración de la permeabilidad, son de menor tamaño en la sensibilización generalizada de la piel.

De acuerdo con nuestro protocolo experimental, ensayamos los dos tipos de reacciones PCA previamente descritas, para cada modelo de estrés, en grupos de 12 ratones BALB/c.

En el caso de sensibilización sistémica, se administra el anticuerpo (Ac) vía i.v., posteriormente se somete al animal a la situación de estrés correspondiente, y al finalizar esta (5 días después), se desencadena la reacción PCA. De este modo, en el espacio de



■ CTR ▨ INM ▤ MFN ■ MF-Nx

* p < 0,05 ** p < 0,01 respecto al control

Fig. 46 Variaciones producidas por el estrés (INM, MFN y Síndrome de Abstinencia) en reacciones PCA con sensibilización local, o de piel completa. Se indica el diámetro de la lesión y el % respecto al control.

tiempo en el que se desarrolla el estrés, se produce la distribución de suero sensibilizante, que queda fijado en las células dérmicas. En el caso de reacción local, se somete a los animales a la situación de estrés, durante el mismo tiempo, y al finalizar ésta, se administra el suero s.c. en zonas localizadas de la dermis; 3 horas más tarde se induce la reacción local administrando el antígeno en la misma zona.

Los resultados obtenidos, que se comparan en las (Figs. 46), demuestran que el método de **sensibilización de piel completa**, por ser más generalizado en cuanto a la lesión, es más susceptible de presentar variaciones de respuesta condicionadas por las situaciones de estrés. Los datos demuestran claramente que el animal reacciona de distinta manera según que haya estado sometido a inmovilización forzada o a morfina dependencia, mostrando una disminución del tamaño de la lesión en el primer caso, para ambos modelos experimentales. En el segundo caso, presenta similar comportamiento para la **sensibilización local**, con respuesta paradójica en el de piel completa; en el que se produce un aumento de la lesión local. Cuando se induce un síndrome de abstinencia, no se observa inhibición de la reacción intradérmica.

IV.2.2.3.- Perfil inmunofarmacológico en reacciones anafilácticas producidas en situaciones de estrés.

Después de comprobar las variaciones de respuesta anafiláctica sistémica (PSA) en cuanto a su manifestación clínica (TL_{50} y mortalidad); es decir, atendiendo a las últimas consecuencias de un cuadro de shock generalizado, se intenta determinar las alteraciones producidas en diversos parámetros. Estos reflejan, tanto el nivel de estrés alcanzado (corticosterona) como aquellas variaciones en el número de células que específicamente responden a un cuadro de hipersensibilización (eosinófilos) o que intervienen en la agresión por IC (plaquetas). También se determinó el estado inmunitario del animal valorando la capacidad de proliferación linfocitaria y las respuestas de citotoxicidad natural.

Para este estudio seleccionamos la relación Ag 0,25/Ac 1 , por ser la que previamente había mostrado un mayor sensibilidad al estímulo del estrés.

Al comparar los datos resumidos en las Figs. 36 y 47, relativas a los niveles de **corticosterona** y número de **eosinófilos** y **plaquetas**, en situaciones de estrés por inmovilización y morfino-dependencia, con o sin intervención de fenómenos anafilácticos, vemos que: en ambas situaciones de estrés y sin que existan fenómenos de hipersensibilización (Fig. 36), aparecen aumentos estadísticamente significativos en el nivel de corticosterona (más en el caso de morfino-dependencia); disminuye el número de eosinófilos circulantes ($p \leq 0,05$); y apenas se aprecia algún cambio (no significativo) en el número de plaquetas, ligeramente aumentadas en morfino-dependencia (MFN). Por otra parte, en los cuadros de anafilaxia y con ausencia de situaciones de ansiedad, sea cual fuere el agente sensibilizante (EDTX o BSA) (Fig. 26) aparece una ligera disminución (variable según los casos) en los niveles de corticosterona, un acusado aumento en el número de eosinófilos y una disminución en el número de plaquetas circulantes.

Cuando ambos cuadros patológicos se yuxtaponen; es decir, que en animales en situaciones de estrés (sistema nervioso afectado) se provoca un cuadro de anafilaxia (sistema inmune afectado), aparecen variaciones de distinto signo según la causa productora de la situación de ansiedad (Fig. 47). Se comprobó que al desarrollar la anafilaxia en situación de estrés, se produce una disminución de los niveles de **corticosterona** previamente elevados, aún cuando se mantienen muy por encima de los valores control (anafilaxia sin estrés), disminuyendo este incremento desde un 32 a un 13%.

En cuanto al recuento de **eosinófilos**, la disminución observada durante las situaciones de estrés (72 y 46 $\text{cél}/\mu\text{l}$ en INM y MFN frente a 96 en el control) se intensificó aún más al desencadenarse la reacción anafiláctica (42 y 28 $\text{cél}/\mu\text{l}$ en PSA+INM o PSA+MFN, respectivamente; $p \leq 0,05$), a pesar de que todos los cuadros de

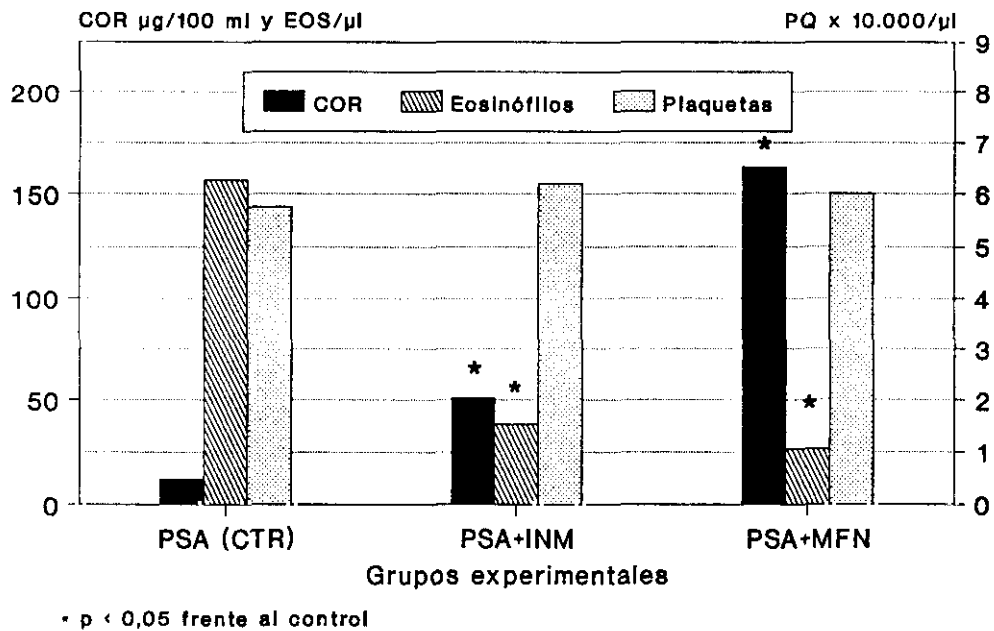


Fig. 47.-Variaciones en los niveles de COR, y recuento de eosinófilos y plaquetas en ratones BALB/c, al provocar una reacción de anafilaxia cutánea en situaciones de estrés por INM y MFN.

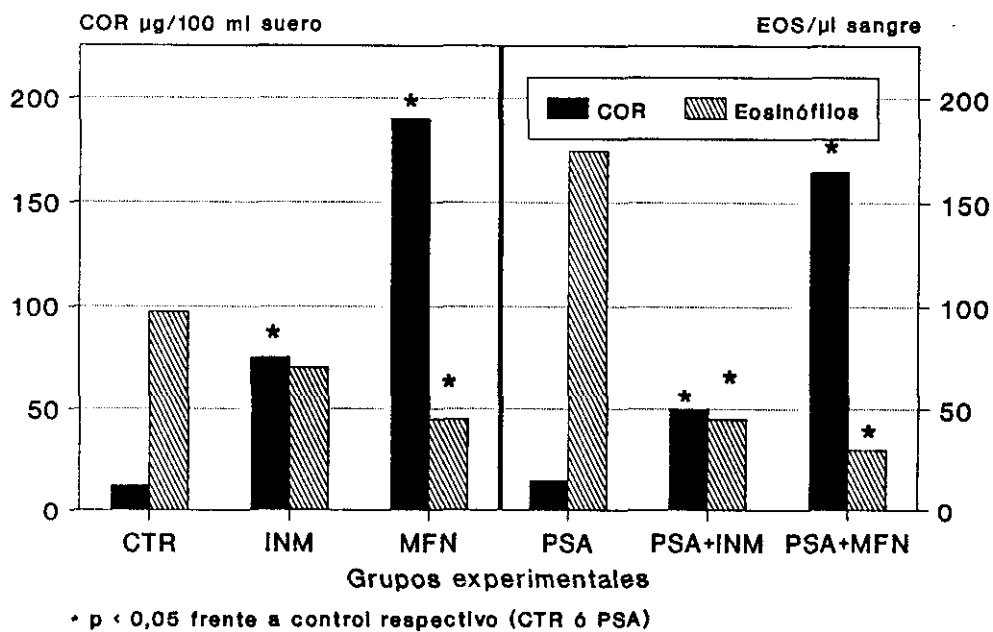


Fig. 48.-Variaciones en los niveles de COR y recuento de eosinófilos en situaciones de anafilaxia asociada a estrés. Se incluyen los valores de referencia para PSA sin estrés e inmovilización, y para morfíno-dependencia sin anafilaxia.

hipersensibilización produjeron un aumento en el número de eosinófilos (168 cél/ μ l), cuando no existían situaciones de estrés(Fig. 48).

Esta interacción entre el estrés y la anafilaxia, produce una depresión a nivel de **respuesta linfoproliferativa intrínseca** (en PBS). De hecho, se observa que el intenso efecto mitogénico propio de un lipopolisacárido (EDTX) (respuesta 350% respecto al control; $p \leq 0,001$), es drásticamente inhibido por el estrés, que lo sitúa en niveles casi normales (122% respecto al grupo control en el caso de INM), o incluso inferiores (83% en el caso de MFN; $p \leq 0,05$) (Fig. 49).

En la mitogénesis inducida por **ConA** o **LPS**, el discreto efecto potenciador de la EDTX (ConA 117%, LPS 134% respecto control) se ve anulado por los agentes estresantes, que lo sitúan en niveles infranormales (para INM: ConA 72%, $p \leq 0,05$; LPS 97%, n.s.; para MFN: ConA 67%, $p \leq 0,05$; LPS 78%, $p \leq 0,05$).

Las variaciones en la liberación y **actividad de la IL-2** discurren paralelamente a las de la blastogénesis ConA inducida (para INM: actividad de IL-2 75%; y para MFN 69%; $p \leq 0,05$) (Fig. 49).

Cuando se estudian las variaciones de **citotoxicidad natural** por células **NK** de origen esplénico, valorada en % de lisis específica en relación frente al control, se ve que la inhibición provocada por la anafilaxia por EDTX-antiEDTX (actividad de células NK del 78% respecto control), aparece algo incrementada en situación de estrés, sobre todo en casos de morfinodependencia (INM 72%, MFN 68%) (Fig. 50).

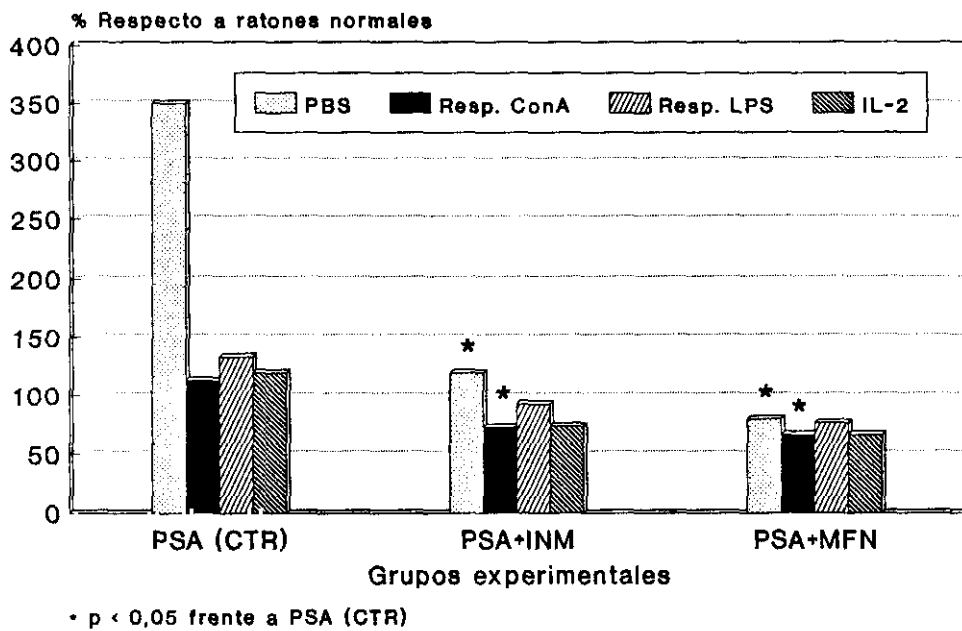


Fig. 49.-Determinación de blastogénesis (intrínseca o mitógeno-inducida) y producción de IL-2 en ratones que sufren una reacción de PSA tras ser sometidos a situaciones de estrés por INM y MFN. Valores expresado en % respecto a control normal.

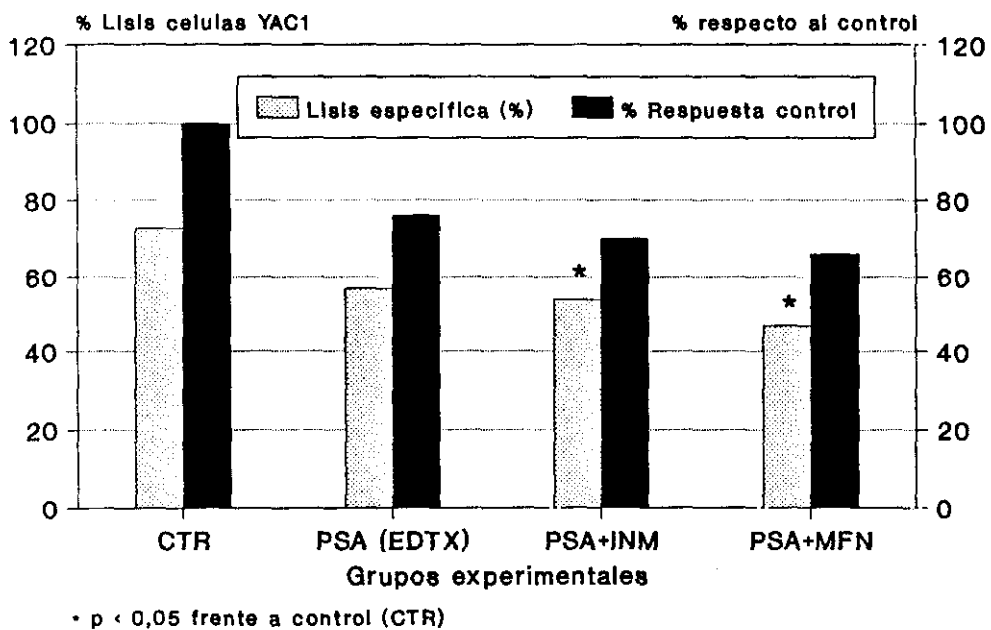


Fig. 50.-Variación en la actividad de células NK obtenidas de ratones sometidos a una reacción de PSA tras sufrir estrés por INM y MFN. Se expresa en % de lisis específica de células YAC.1.

IV.3.- MODULACION FARMACOLOGICA DE LA INTERACCION NEURO-INMUNITARIA EN SITUACIONES DE ESTRES.

Hemos evaluado las modificaciones que se producen en la respuesta inmunitaria en situaciones de estrés, midiendo esta respuesta tanto a nivel celular "*ex vivo*", como en reacciones de anafilaxia "*in vivo*". Se estudian las posibilidades de modificar esta interaccion por medio de distintos tratamientos. En este apartado hemos seleccionado los parámetros inmunológicos a controlar en cada grupo: así, para algunos grupos de fármacos, se estudia exclusivamente el modelo de PSA, puesto que de esta manera podemos controlar la respuesta inmune en su totalidad; mientras que en el resto, empleamos determinaciones de actividad linfoblástica y de otros parámetros celulares.

Se ha intentado modular la inmunodepresión producida en situaciones de estrés a distintos niveles: **a)** fármacos adaptógenos que disminuyen el nivel de estrés; **b)** fármacos reguladores de la respuesta inmune a partir del sistema nervioso; **c)** fármacos reguladores de los sistemas serotoninérgico e histaminérgico; y **d)** fármacos implicados en el brazo efector de la respuesta inmune propiamente dicha (antiinflamatorios y moduladores del Complemento).

En aquellos casos en los que se utilizó la reacción PSA, se desarrolló el protocolo experimental como se resume a continuación: a) Sensibilización pasiva por administración i.v. del anticuerpo específico anti-EDTX; b) establecimiento de un cuadro de estrés experimental por inmovilización o por morfina dependencia; c) instauración de las diferentes pautas de tratamiento farmacológico, que coinciden en parte con el periodo en que se desarrolla el cuadro de estrés; d) administración i.v. del antígeno (EDTX) para desencadenar la respuesta anafiláctica de carácter sistémico (PSA).

La valoración del cuadro se realiza a través de los parámetros habituales (mortalidad, TL_{50} , recuento de eosinófilos y plaquetas, así como niveles de COR).

IV.3.1.- Tratamiento con eleuterósidos.

Se comenzó por estudiar el posible efecto inmunoestimulante de eleuterósidos de naturaleza saponínica, existentes en algunos extractos vegetales, como en el *Eleuterococcus senticosus*. Se comprobó en primer lugar, si los extractos a utilizar tenían alguna actividad biológica sobre esplenocitos procedentes de ratones BALB/c, a los que se había administrado 6 a 12 dosis diarias de 10 mg/Kg de dicho extracto. Como puede verse en la Fig. 51, los eleuterósidos administrados según nuestro protocolo, no tuvieron efecto por sí mismos sobre la blastogénesis, ya sea intrínseca o mitógeno inducida. Por otro lado, los niveles de corticosterona en el suero de dichos animales, experimentó un ligero descenso, que no parece correlacionarse con el tiempo de tratamiento.

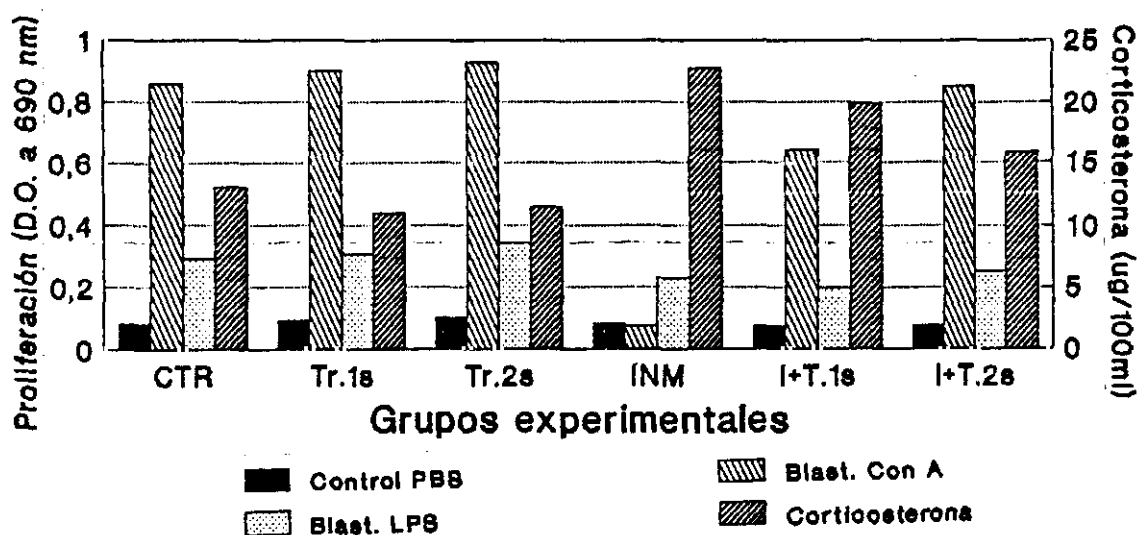
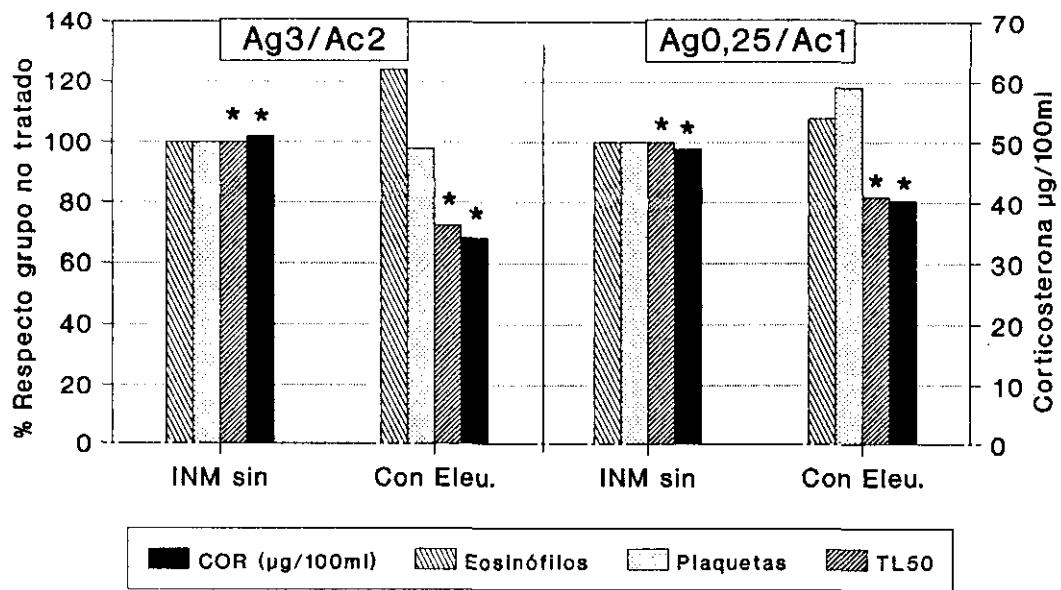


Fig. 51.-Variaciones en la respuesta linfoproliferativa y niveles de COR de ratones tratados con *eleuterósidos* durante una o dos semanas. El tratamiento se aplica a ratones control y sometidos a inmovilización.

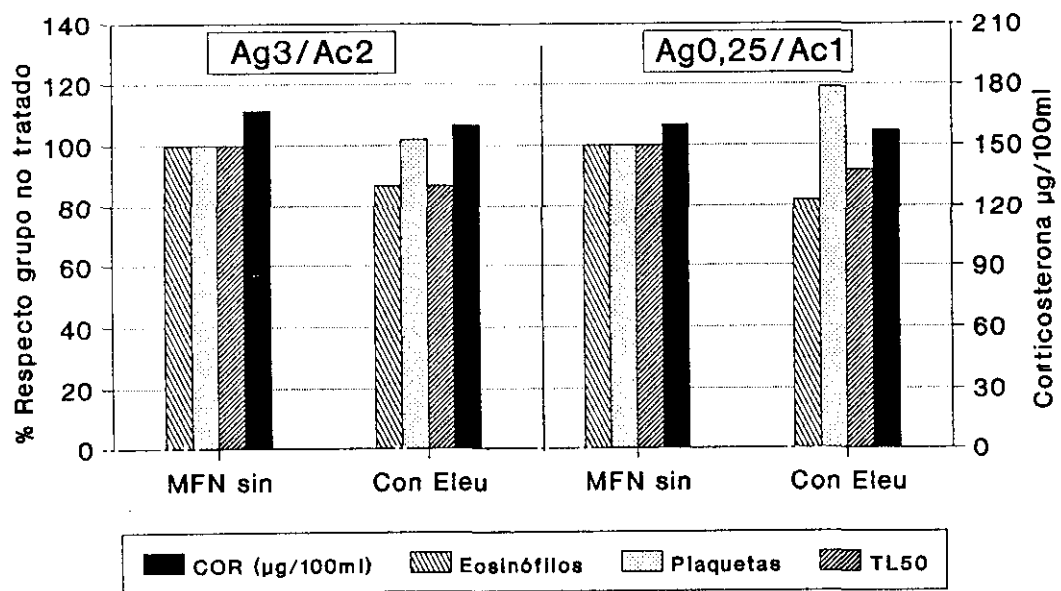
En cuanto a su efecto sobre ratones sometidos a situaciones de estrés por **inmovilización** (Fig. 51), se produjo una disminución significativa de los niveles de corticosterona, previamente elevados, descendiendo desde 23.2 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ hasta 20 ($p = \text{n.s.}$) y 15.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ($p \leq 0,05$), para una y dos semanas de tratamiento respectivamente, con una inmunorrestauración específica sobre las células T **ConA** inducidas. En efecto, la proliferación celular, medida según el método de densidad óptica descrito previamente; se había reducido desde 0.88 en los ratones control hasta 0.08 en los ratones inmovilizados. Con la administración de los eleuterósidos se consiguió una restauración parcial en la primera semana de tratamiento, (D.O. 0,65nm.), y total tras dos semanas (D.O. 0,86nm.; $p \leq 0,05$). La proliferación de las células **LPS**-sensibles, que había disminuido desde 0.3 en el grupo control, hasta 0.21 en el grupo de animales inmovilizados, no presentó apenas variaciones debidas al tratamiento (0.2, y 0.22 para una y dos semanas, respectivamente; $p = \text{n.s.}$).

El estudio de las modificaciones de la respuesta inmune "*in vivo*" (PSA), en ratones sometidos a situaciones de estrés, se efectuó implantando tratamientos de tres semanas (30 mg/Kg/día, por vía oral); en la segunda semana se efectuaba la hipersensibilización con el antisuero específico (anti-EDTX) y se continuaba el tratamiento con extracto de *eleuterococo* durante otra semana; y en la tercera semana se hacía coincidir la situación de estrés (por inmovilización o por morfina dependencia), con la hipersensibilización. Al concluir esta tercera semana de tratamiento, se inyectaba el antígeno correspondiente (EDTX), valorando los cambios según los parámetros descritos previamente; los resultados se resumen en las Fig. 52 a,b.

Así, los niveles de **corticosterona**, aumentados en respuesta al estrés por **inmovilización**, descendieron con el tratamiento en las dos proporciones de Ag/Ac (34 frente a 52 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ del control, para el exceso de Ag, $p \leq 0,05$; y 40,4 frente a 49 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ con exceso de Ac). El tratamiento produjo un aumento en la actividad del cuadro de



* p < 0,05. frente a grupo no tratado



* p < 0,05. El resto n. s.

Fig. 52.-Efecto del tratamiento con *eleutherosidos* sobre los parámetros de una reacción de PSA, inducida en ratones sometidos a estrés por inmovilización (arriba), o por morfinedependencia (abajo).

anafilaxia, con un acortamiento del TL_{50} (reflejo de una recuperación de la actividad inmunológica). Este efecto fue más acusado para este modelo, en el que el TL_{50} disminuye un 25,8%, en el caso de exceso de Ag, y un 18,2% con exceso de Ac. El número de **eosinófilos** aumentó con el tratamiento en proporciones variables ($p = n.s.$) y no se produjo variación significativa en el número de **plaquetas** circulantes.

En el grupo de ratones **morfino dependientes**, el efecto sobre la **COR** sérica, fue mucho menos intenso que en el grupo anterior, puesto que descendió de 167 a 160 $\mu\text{g/ml}$, y de 156 a 148 $\mu\text{g/ml}$, sin alcanzar significación estadística. El TL_{50} presentó una disminución escasa (entre un 8 y un 11%; $p = n.s.$), el recuento de **eosinófilos** descendió, y no se detectó variación en el número de **plaquetas**. (Fig. 52 b).

IV.3.2- Utilización de dietil-dithiocarbamato (DTC).

De los distintos inmunomoduladores a nuestro alcance, la molécula de DTC es la más interesante desde el punto de vista de la modulación neuroinmune, dado su efecto específico a nivel del neo-córtex. El modelo se desarrolla según el protocolo general descrito, con la administración subcutánea de sucesivas dosis de DTC durante la semana en que se somete a la situación estresante.

En primer lugar se comprobó si la dosis media utilizada en otras ocasiones era la más indicada en estos casos, seleccionando la dosis de 25 mg/Kg de peso/día diluido en 0,1 ml. En la Fig. 53 se resumen los resultados obtenidos en varias series experimentales de ratones BALB/c sometidos a diferentes ensayos de estrés y anafilaxia, con y sin tratamiento. Se comprueban así, las variaciones debidas al uso del fármaco en cada situación, indicando en la tercera barra de cada grupo de resultados, el cambio porcentual provocado por el DTC. Se definen los grupos control (CTR), endotoxina (EDTX), inmovilización (INM), y morfino dependencia (MFN); estos dos últimos con y sin reacción de PSA añadida.

Se confirmó de nuevo que la hipersensibilización con EDTX, produce un leve aumento en la reactividad de las células T; de igual forma, comprobamos una disminución de la respuesta linfoproliferativa debida al estrés, que fue más intensa en los cuadros de morfino-dependencia. En los casos en que a la situación de estrés se superponía un estado de sensibilización, se inhibió aún más la respuesta de las células T, especialmente en el caso de la morfino-dependencia (primera columna de cada grupo en la Fig. 53).

Si ahora observamos estos parámetros en los grupos que han sido **tratados con DTC**, según el protocolo descrito (segundas barras de cada grupo, en Fig. 53), se puede ver como en el grupo control aparece un efecto inmunopotenciador intrínseco del fármaco, equivalente al 133 % (comparando con el CTR, tercera barra). Este efecto se mantiene en ratones inmunodeprimidos a consecuencia del estrés, con o sin situaciones de anafilaxia añadida, en diferente proporción para cada grupo. El máximo efecto restaurador aparece en aquellos grupos en los que existe una situación de estrés con intervención de morfino-dependencia, ya sea sola (128% respecto al grupo equivalente no tratado, $p \leq 0,05$), o

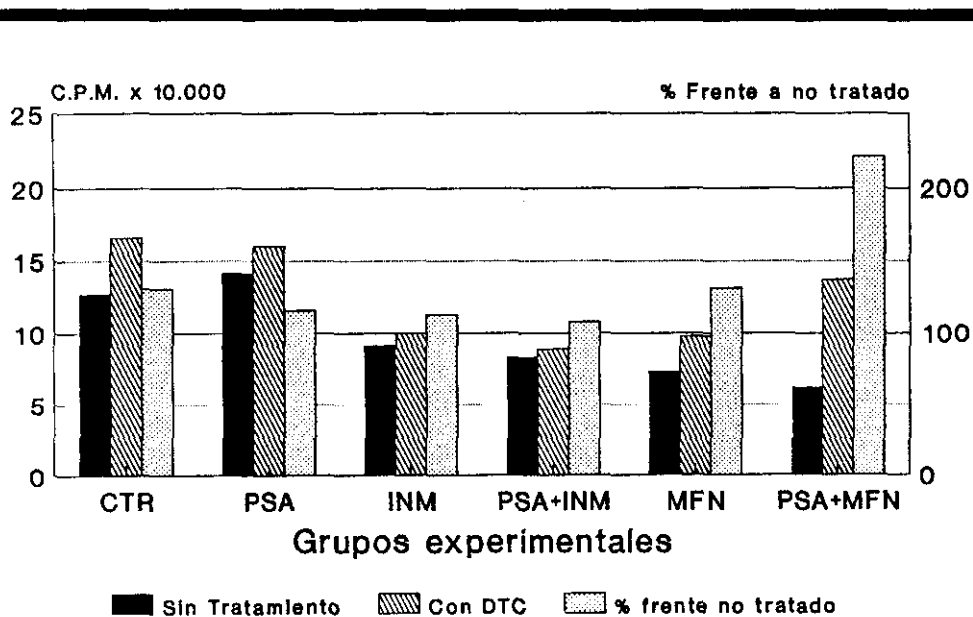


Fig. 53.-Variaciones en la mitogénesis ConA inducida, producidas por el tratamiento con DTC en ratones sometidos a situaciones de estrés, anafilaxia, o ambas.

combinada con una sensibilización anti-EDTX (227% respecto al grupo sin DTC $p \leq 0,05$).

En cuanto a la intervención del DTC en la inducción del estrés, se controla mediante determinación del nivel de **corticosterona** en suero a tiempos variables (Fig. 54).

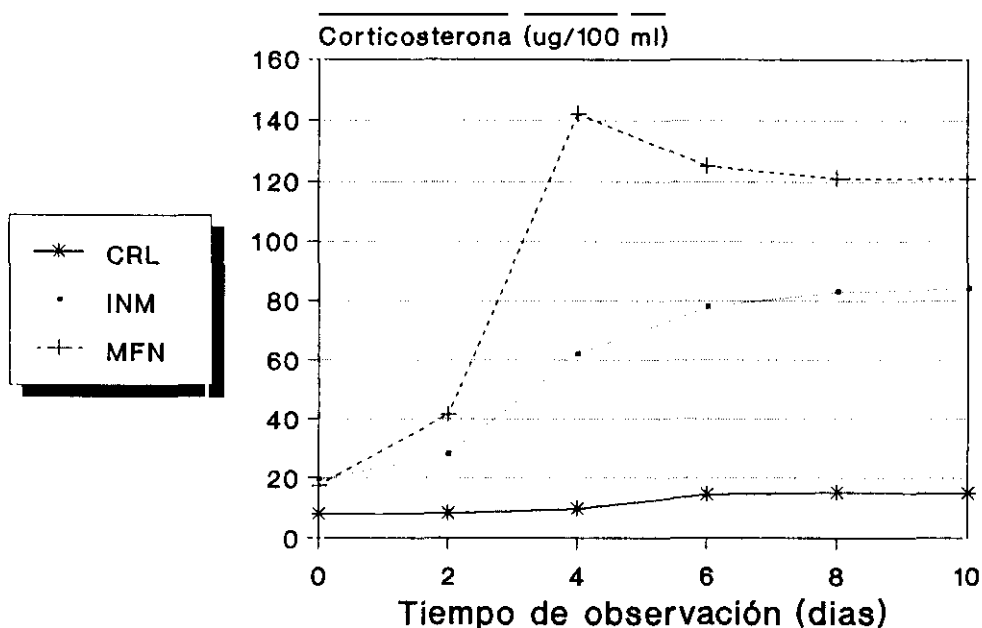
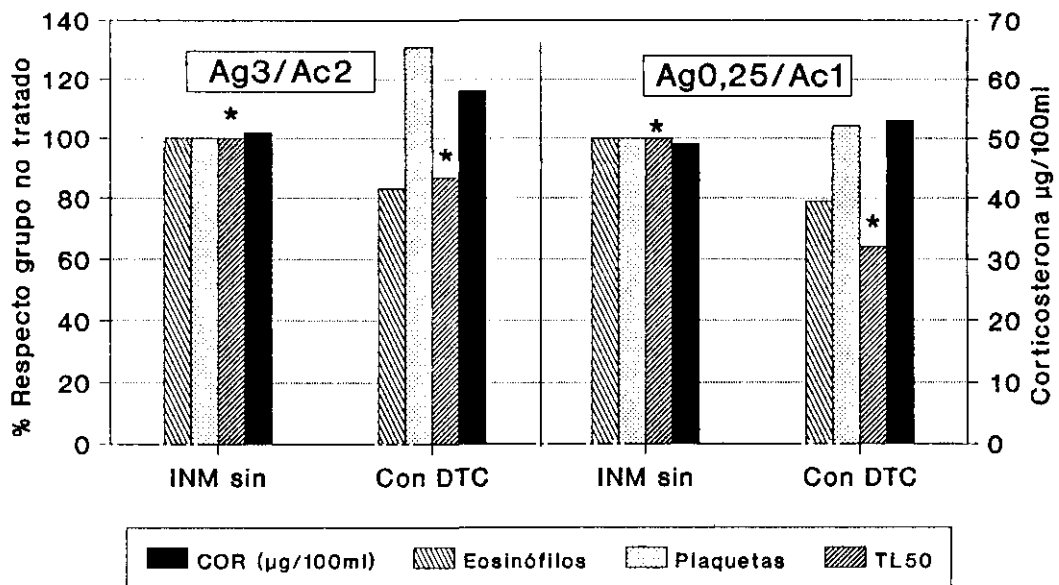


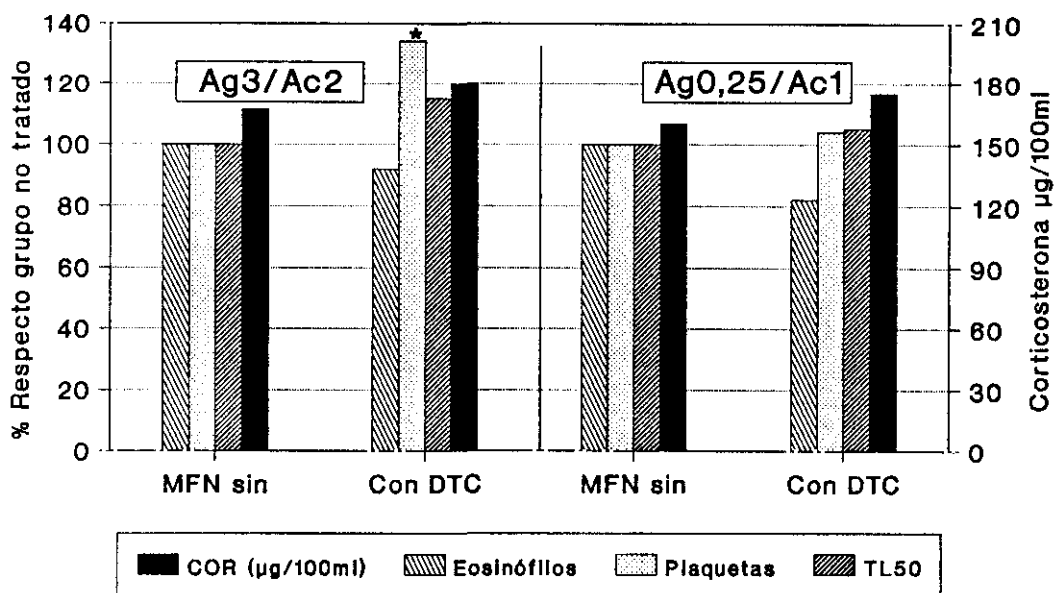
Fig. 54.-Variaciones en los niveles de COR a lo largo del tratamiento con DTC aplicado a ratones sometidos a estrés por INM y MFN.

El efecto del tratamiento con DTC sobre las reacciones de anafilaxia en situaciones de estrés se resume en la Fig 55. En el grupo de **Inmovilización** se comprobó una restauración parcial de la actividad anafiláctica, con una disminución del TL_{50} del 36% en el caso de exceso de Ac ($p \leq 0,05$), y del 13% en exceso de Ag. En ambas situaciones se confirmó un leve incremento de los niveles de COR sérica ($p = n.s.$), con escasas variaciones en los recuentos de eosinófilos (-17,7% y -19% para ambos grupos; $p = n.s.$), y con recuentos plaquetarios prácticamente estables.

En el grupo de **morfino-dependencia**, se produjeron discretos aumentos de la COR sérica, con incrementos (15%) del TL_{50} en el modelo Ag3/Ac2, y con incrementos en el recuento plaquetario ($p \leq 0,05$ en el caso de Ag3/Ac2); y sin cambios significativos en los otros parámetros (Fig. 55 b).



* p < 0,05 frente al grupo no tratado



* p < 0,05 frente al grupo no tratado

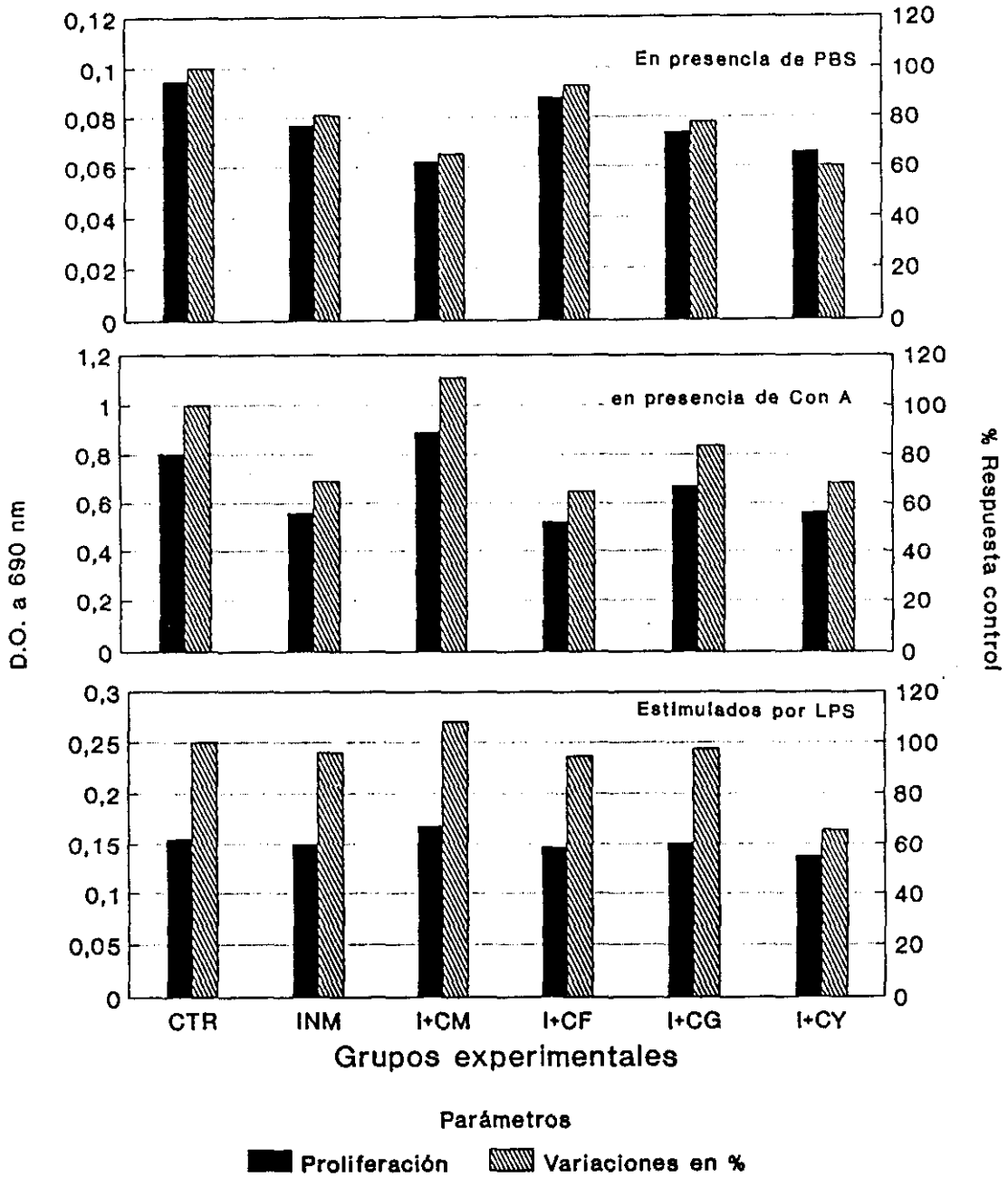
Fig. 55.-Efecto del tratamiento con DTC sobre los parámetros de una reacción de PSA, inducida en ratones sometidos a estrés por inmovilización (arriba), o morfinedependencia (abajo).

IV.3.3.-Utilización de antihistamínicos y antiserotonínicos.

Se han utilizado cinco fármacos distintos: a) **cromoglicato (CG)**, que tiene capacidad para inhibir la liberación de mediadores de mastocitos activados; b) **ciproheptadina (CY)**, que actúa como anti-serotonérgico principalmente, aunque también tiene una débil acción como anti-colinérgico; y c) fármacos antihistamínicos como la **clorfeniramina (CF)** y la **tripelenamina (TP)**, que tienen actividad bloqueante anti-H1, con más o menos efectos centrales, respectivamente; y la **cimetidina (CM)** que actúa como bloqueante anti-H2. Con estos tratamientos se pretende una aproximación a los mecanismos farmacológicos que puedan modificar la interacción neuroinmune.

Se ha seguido el mismo desarrollo que en los anteriores apartados; primero se ha instaurado un tratamiento de una semana coincidente con la aplicación del agente estresante, y posteriormente se ha determinado la respuesta linfoproliferativa, comparándola con el grupo no tratado. Completamos el ensayo provocando una reacción PSA sobre el animal sometido a estrés, y analizando los parámetros habituales del grupo control con el tratado.

Los resultados referentes al modelo de **inmovilización** se muestran en las figuras 55 y 56. Así, es posible ver que el **cromoglicato** presentó un efecto potenciador inespecífico de la respuesta inmune en los ensayos de mitogénesis intrínseca (PBS), con una respuesta del 95% frente al 81% en el grupo no tratado (% respecto al control); la mitogénesis ConA-inducida mejoró discretamente (63% frente a 57%); y las células LPS-sensibles no modificaron su respuesta con el tratamiento (Fig. 56). No hemos encontrado diferencias significativas debidas al tratamiento en los parámetros (TL_{50} , recuentos de eosinófilos y plaquetas). Los niveles de COR, determinados en el grupo sometido a una reacción de PSA, no variaron significativamente (Fig. 57 a,b).



Figs. 56 a, b y c.-Efecto de los tratamientos con: cimetidina (CM), clorfeniramina (CF), cromoglicato (CG), y ciproheptadina (CY) sobre la respuesta blastogénica de ratones sometidos a estrés por inmovilización.

Se ha comprobado que el tratamiento con **ciproheptadina** produce un marcado efecto inmunosupresor, tanto en la mitogénesis intrínseca (60% frente al 80% del grupo no tratado, $p \leq 0,05$), como en la LPS-inducida (61% frente al 90%, $p \leq 0,05$). Sin embargo, la actividad de las células ConA-sensibles, que constituía el grupo más afectado por el estrés, no sufrió apenas cambios (Fig. 56). En el modelo de PSA para la proporción Ag3/Ac2, disminuyen apreciablemente los niveles de COR, y el TL_{50} se prolonga alcanzando niveles del 172% respecto al control (Fig. 57 a). Los resultados para la proporción Ag0,25/Ac1 muestran diferencias de tipo cuantitativo, aunque son del mismo signo y proporción.

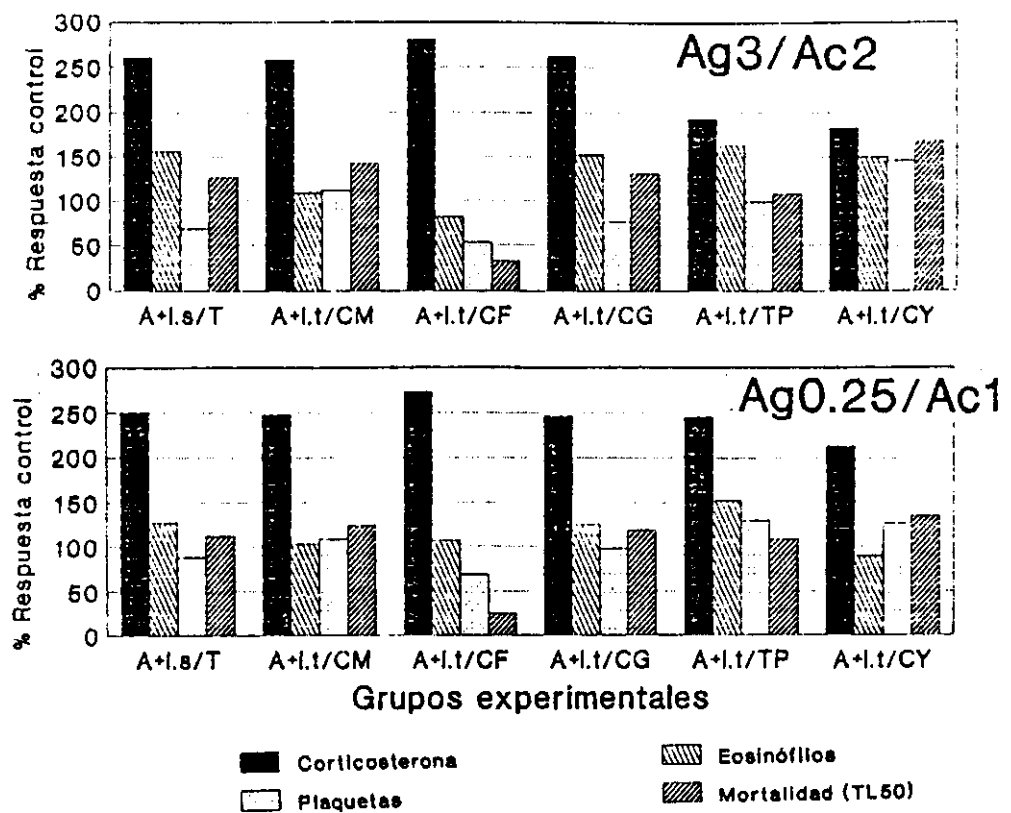


Fig. 57 Efecto de los tratamientos con: cimetidina (CM), clorfeniramina (CF), cromoglicato (CG), y ciproheptadina (CY) sobre los parámetros de una reacción de PSA en ratones sometidos a estrés por inmovilización.

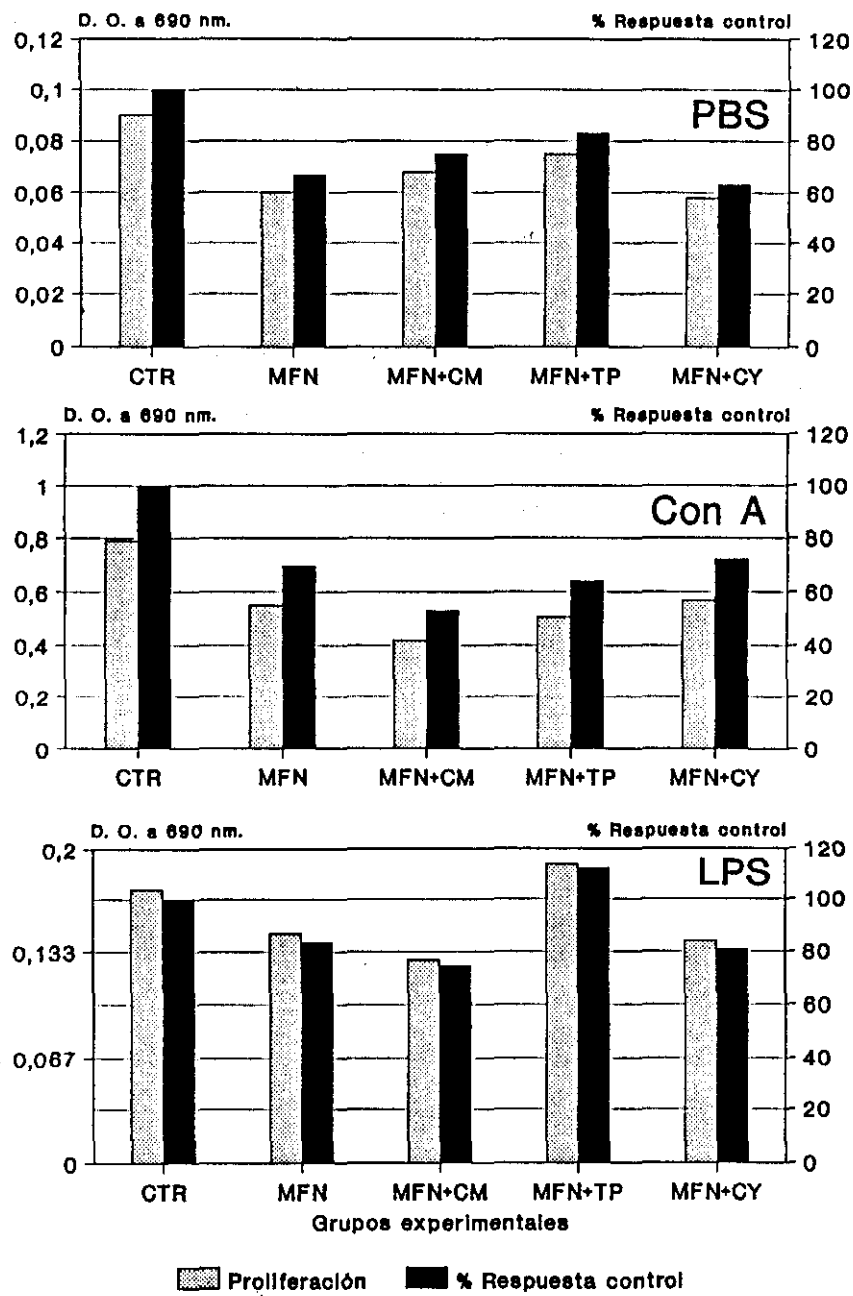
La **clorfeniramina** demostró un efecto inmunorrestaurador selectivo sobre la mitogénesis intrínseca, alcanzando los niveles del grupo control sin estrés (100%). No se apreciaron modificaciones en la mitogénesis ConA ni LPS-inducida. Sin embargo, en los ensayos "*in vivo*" con reacciones de anafilaxia sistémica se observó una mortalidad precoz de los animales, incluso antes de terminar el tiempo previsto para el ensayo, esto hace que los datos obtenidos sean de escasa significación, y de difícil interpretación (Figs. 56 y 57).

La **tripelenamina** demostró una restauración de la mitogénesis ConA-inducida hasta alcanzar los valores del control no estresado (100% tras tratamiento frente a 72% antes del tratamiento, $p < 0,05$), las células LPS-sensibles también aumentaron su actividad (110% frente a 74% antes del tratamiento, $p = n.s.$). El TL_{50} de la reacción de PSA disminuyó, y aumentó el número de plaquetas, todo ello sin que se observaran variaciones en los niveles de COR. (Fig. 57 a, b).

Para los ensayos correspondientes a la **morfino-dependencia (MFN)**, dejaron de utilizarse dos fármacos : el cromoglicato, por la falta de resultados de interés en el modelo de INM; y la clorfeniramina, por las complicaciones letales detectadas en los ensayos previos. Del mismo modo, a la vista de la similitud de resultados encontrados en el modelo de INM para este grupo de fármacos, se suprimió el ensayo con Ag 0.25/Ac 1. Los resultados correspondientes a los restantes se resumen en las Figs. 58 y 59.

La **ciproheptadina** presentó, en este caso, una leve disminución de la actividad mitogénica intrínseca (que bajó del 71% al 60%, respecto al control normal) con un claro descenso de la mitogénesis LPS-inducida (del 95%, en el grupo no tratado, baja al 65%), y sin cambios en las células ConA-sensibles. En el caso de reacción de PSA añadida, el TL_{50} aumentó, con una disminución del número de eosinófilos. Esto se desarrolla en el seno de unos niveles de COR que se elevan aún más que en el grupo no tratado.

La **tripelenamina** presentó, al igual que en el modelo de inmovilización, una recuperación de actividad mitogénica en las células LPS y ConA-sensibles (Fig. 58),



• $p < 0,05$ frente a control (CTR)

Figs. 58 a, b y c.-Efecto de los tratamientos con: cimetidina (CM), tripelenamina (TP), y ciproheptadina (CY) sobre la respuesta blastogénica de ratones sometidos a estrés por morfíno-dependencia.

aunque en este modelo no llegó a alcanzar los valores control. En las reacciones de PSA se observó un nivel de COR que permanece elevado, y un acortamiento del TL_{50} .

La **cimetidina** presenta resultados muy variables en los diferentes ensayos, y con gran dispersión de los resultados, habiéndose constatado una disminución de la mitogénesis LPS inducida ($p = n.s.$), sin otras alteraciones.

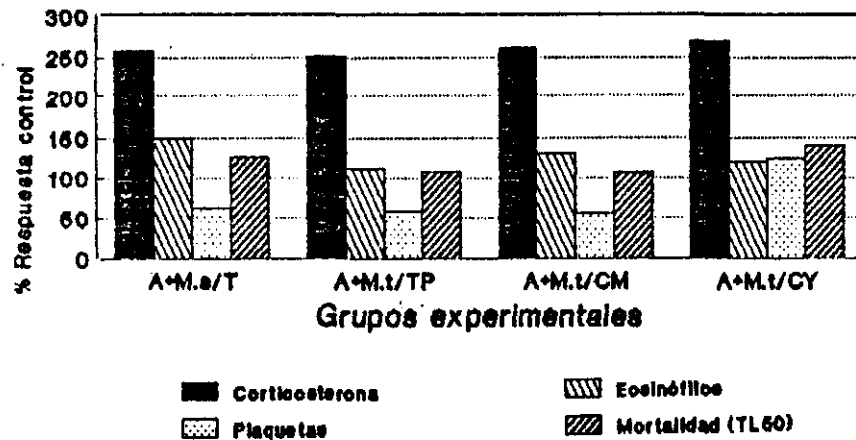


Fig. 59.-Efecto de los tratamientos con: cimetidina (CM), tripelenamina (TP), y ciproheptadina (CY) sobre los parámetros de una reacción de PSA en ratones sometidos a estrés por morfinedependencia.

IV.3.4.-Utilización de antiinflamatorios, agentes plaquetarios e inhibidores del complemento.

Se han seleccionado los siguientes fármacos : antiinflamatorios como el **ac. flufenámico**, y la **indometacina**; inhibidores del complemento como la **suramina** y otros con efecto sobre las plaquetas como la **ticlopidina**. Los hemos administrado durante la semana en la que se sometía a los ratones a situaciones de estrés, desarrollando a continuación las reacciones de anafilaxia pasiva (PSA) con diferentes proporciones de Ag/Ac, y comparando con los grupos no tratados. Las Tablas X y XI muestran los resultados del ensayo en el grupo control y de estrés por INM, posteriormente se resaltan los cambios producidos por los tratamientos en cuanto a COR, TL_{50} , y % de mortalidad en las Figuras 60 a, b , y c.

El tratamiento con **suramina** agudizó el cuadro de **anafilaxia (PSA)** con exceso de Ag, acortando el TL₅₀ en este grupo (pasa de 14,8 a 5,9 horas; $p \leq 0,05$); mientras que queda en el mismo rango que el grupo con exceso de Ac, que no sufrió modificaciones con el tratamiento (4,9 y 5,3 horas para los grupos con y sin tratamiento). La cifra de eosinófilos disminuyó en todos los grupos, y la de plaquetas prácticamente no se modificaron (Tabla IX). En el grupo de **Inmovilización (INM)** los resultados son similares, con la reducción del TL₅₀ en el grupo de exceso de Ag. Los niveles de COR no sufren modificación apreciable en los ratones estresados (48 frente a 43,2 y 49,8 frente a 51,3 para los grupos con exceso de Ag o de Ac respectivamente). La falta de efecto sobre el mecanismo de estrés, y la homogeneidad de los resultados, justifican su abandono para el modelo de MFN

El tratamiento con **Indometacina** atenuó la **reacción anafiláctica**, desarrollando un cuadro clínico con un TL₅₀ prolongado (18,2 frente a 14,8 horas en el modelo 3/2, y 6,2 frente a 4,9 horas en el modelo 0,25/1), y una mortalidad menor (91,6% para ambos modelos frente a 100% en el control). Esto se reflejó en una corrección del número de plaquetas y eosinófilos, con un aumento de las primeras, previamente disminuidas; y una disminución de los segundos, previamente aumentados por la reacción PSA. Los niveles de COR muestran variaciones muy discretas (más 10 y menos 7% respectivamente para las dos relaciones de Ag/Ac), lo que hace pensar en un efecto no mediado por dicho eje hormonal (Fig. 60 a,b,c).

Sin embargo, en los ratones sometidos a estrés por **Inmovilización**, se produjo una elevación del nivel de COR, que pasó de 50,6 a 81 $\mu\text{g/ml}$ en el modelo de Ag3/Ac2, y de 51 a 98 $\mu\text{g/ml}$ en el caso de exceso de anticuerpo. Este efecto potenciador del estrés, y por tanto inmunosupresor, se sumó al efecto protector del fármaco, por lo que el TL₅₀ se prolongó aún más, y la mortalidad disminuyó (22,3 frente a 21,5 horas y 75 frente a 83% en el grupo Ag 3/Ac 2; y 9,3 frente a 7,8 horas, aunque sin cambios de mortalidad en el

Tabla X .-Estudio de los parámetros habituales en la reacción de PSA, provocada en ratones BALB/c con y sin estrés por inmovilización en función del tratamiento con suramina.

Ag 3/Ac 2	Control	INM SIN Tto	Control CON Tto	INM CON Tto
COR Sérica	11,7	50,6	10,9	48,1
EOSINOFILOS	152	43	98	65
PLAQUETAS	5,62	6,84	4,25	7,89
TL50	14,8	21,5	5,8	8,2
% de Mortalidad	100%	83,3%	100%	91,6%
<hr/>				
<u>Ag 0,25/Ac 1</u>				
COR Sérica	13,2	51,3	12,8	49,8
EOSINOFILOS	122	58	92	69
PLAQUETAS	8,9	10,6	9,1	9,9
TL50	4,9	7,8	5,3	6,9
% de Mortalidad	100%	75%	100%	75%

Tabla XI .-Variaciones en niveles de corticosterona (COR), recuento de eosinófilos (EOS) y plaquetas (PQ); así como en TL50 y porcentaje de mortalidad, en reaccion PSA, en ratones BALB/c con y sin estrés por inmovilización, en función del tratamiento recibido. Se emplearon: Ac. Flufenámicoe Indometacina, en reacciones de PSA para dos proporciones Ag/Ac.

Ag 3/Ac 2	CRL SIN Tto	INM SIN Tto	CRL Ac. Flu	INM Ac. Flu	CRL Indo.	INM Indo.
COR	11,7	50,6	9,2	25,9	12,9	81
EOS	152	43	103	78	110	82
PQ	5,62	6,89	7,9	7,2	10,9	10,1
TL50	14,8	21,5	11,6	19,2	18,2	22,3
% de M,	100%	83,3%	100%	83%	91,6%	73%
<hr/>						
Ag0,25/ /Ac1						
COR	13,2	51,3	9,8	45	12,3	98
EOS	122	58	116	68	114	70
PQ	8,9	10,6	11,8	11,5	9,1	11,9
TL50	4,9	7,8	7,3	7	6,2	9,3
% de M	100%	75%	100%	75%	91,6%	75

Nota:Valores del control no sensibilizado COR:7,5; EOS.51,6; y PQ: 12,2x10e5.

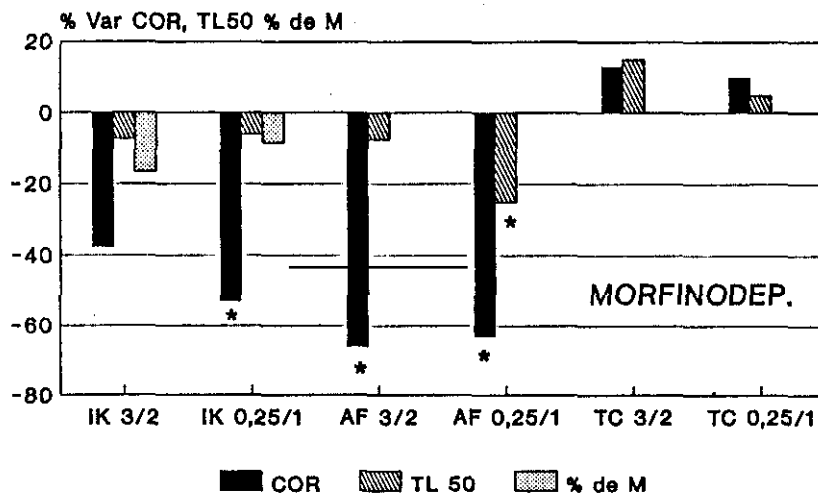
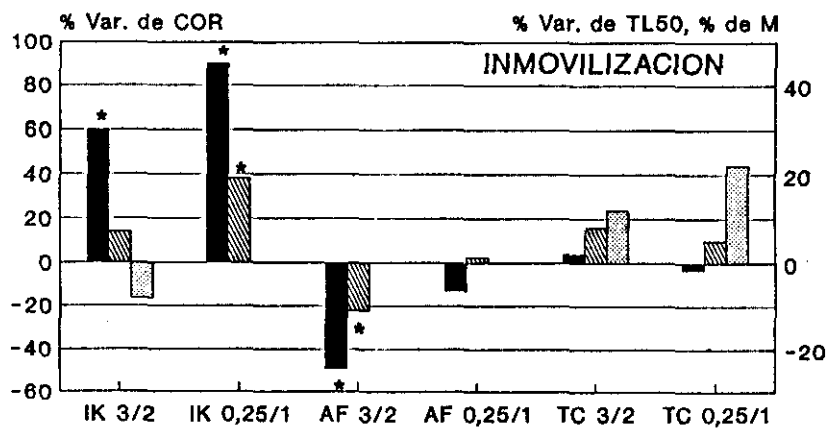
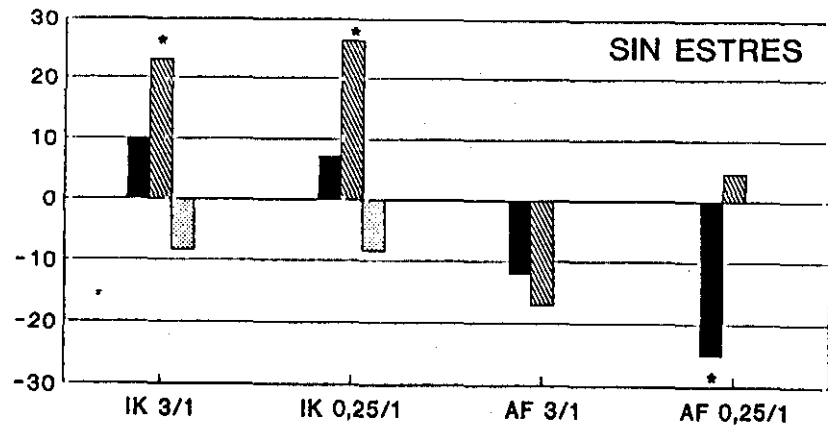
grupo Ag 0,25/Ac 1). El efecto sobre plaquetas y eosinófilos se mantuvo (82 eosinófilos/ μ l sobre 43 del control, y 10,1 frente a $6,89 \times 10^5$ plaquetas/ μ l en el caso de exceso de Ag) (Fig. 60 a,b,c). Como puede verse las diferencias entre las dos proporciones de Ag/Ac son de escasa cuantía, lo que permite suponer que el efecto del fármaco no esté mediado por el complemento.

Hemos constatado en el modelo de **morfino-dependencia (MFN)**, una disminución de los niveles de COR, aunque persisten muy por encima de lo normal. Por otro lado, se mantiene el efecto propio del fármaco, con leves diferencias numéricas respecto al otro grupo de estrés, con disminución de eosinófilos, y aumento de las plaquetas (52 frente a 58 cél/ μ l, y 12,5 frente a $10,6 \times 10^5$ plaquetas/ μ l; en el modelo de exceso de Ac). El resto de los resultados pueden obtenerse de la Figura 60 c. La suma de estos dos efectos, dió como resultado un cuadro clínico más acelerado, pero con menor mortalidad (16,9 frente a 18,2 horas y 75% frente a 91,66% en el grupo Ag 3/Ac 2; 8,1 frente a 8,6 horas y 75% frente a 83,3% en el otro grupo).

El siguiente fármaco seleccionado es el **Ac.Flufenámico**, otro antiinflamatorio con efecto sobre el sistema de complemento. El efecto de este fármaco difiere del anterior. En primer lugar hemos encontrado una reducción de los niveles de COR elevados en las situaciones de inmovilización (25,9 frente a 50,6 en los grupos de exceso de antígeno; y 45 frente a 51,3 en el otro grupo), y de morfino-dependencia (42,5 frente a 173, y 62 frente a 171 en ambos modelos de PSA) (Fig. 60). Este efecto trajo como consecuencia la corrección parcial de la inmunodepresión con TL_{50} acortados, aunque no se observaron cambios en la mortalidad (datos en la Tabla X). Sin embargo, en el modelo de Ag 0,25/Ac 1 se reprodujo este efecto, aunque en menor cuantía. Esto parece deberse a la inhibición que dicho fármaco ejerce sobre el sistema de Complemento, que como hemos comentado previamente se ve implicado de una forma más directa en el modelo de PSA con exceso de Ag, y de hecho puede comprobarse un alargamiento similar de los TL_{50} en el grupo no

estresado (Fig. 60). Las variaciones en el número de plaquetas y eosinófilos son del mismo signo que en el caso del otro antiinflamatorio ensayado, aunque con diferencias numéricas (Tabla X).

En el ensayo con **ticlopidina** se encontraron discretos incrementos de COR para todos los modelos ensayados ($p = n.s.$), con la consiguiente prolongación del TL_{50} . Como era esperable, el recuento plaquetario disminuyó en todos los casos, aunque con diferente intensidad. Sin embargo, no pueden anotarse diferencias notables entre los dos tipos de reacciones PSA, producidas según la relación Ag/Ac, por lo que no parece mediar efecto alguno sobre el complemento (Fig 60 b y c).



* p < 0,05 frente a grupo no tratado

Fig. 60.-Efecto de los tratamientos con: ac. flufenámico (AF), indometacina (ID) y ticlopidina (TC), sobre los parámetros de una reacción de PSA en ratones control (arriba), y sometidos a estrés por inmovilización o morfinodependencia (abajo).

V. DISCUSSION.

Podemos considerar que las observaciones clínicas iniciales de que las situaciones de estrés podían asociarse a un aumento de la patología infecciosa y a una disminución de los sistemas de defensa del organismo, constituyen el punto de partida para el estudio de las interacciones neuro-inmunes. En nuestro trabajo, hemos pretendido obtener modelos experimentales que nos permitieran estudiar detalladamente aquellas alteraciones que las situaciones de estrés pueden producir en las respuestas inmunitarias; al mismo tiempo, hemos estudiado el efecto de distintos fármacos, en un doble intento de conocer mejor los mecanismos íntimos de comunicación neuro-inmune y su posible modulación farmacológica.

De aquí, que los resultados obtenidos nos permitan establecer su discusión desde distintos puntos de vista, como son: a) los modelos experimentales utilizados; b) la resultante de la interacción entre la anafilaxia y el estrés; y c) las posibilidades de manipulación farmacológica.

V.1.- DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS.

Para comprender las **alteraciones inmunes**, hemos realizado estudios celulares "*ex vivo*", seleccionando parámetros inmunológicos capaces de reflejar la actuación de los diferentes grupos de células inmunocompetentes, mientras que los estudios "*in vivo*", nos han permitido conocer el funcionamiento integrado de todo el sistema inmunitario, manteniendo intacto el eje neuro-inmune en el animal. Para ello, desarrollamos modelos normalizados de anafilaxia pasiva experimental, tanto a nivel sistémico (PSA) como cutáneo (PCA).

La circulación y fijación de los inmunocomplejos en vasos y tejidos orgánicos no es consecuencia de un sencillo mecanismo de difusión, como se demuestra por la

imposibilidad de inducir cuadros patológicos mediante la simple administración pasiva de complejos Ag/Ac por vía endovenosa. Incluso cuando esto llega a ocurrir, el cuadro patológico es siempre muy benigno (COCHRANE y KOFFLER, 1973) y por tanto, no serviría para extrapolarlo a situaciones patológicas reales. Por tanto, hemos de producir dichos cuadros mediante la formación de inmunocomplejos "*in vivo*"; de aquí, el interés del modelo aplicado, en el que se ha estudiado la influencia de las proporciones Ag/Ac, puesto que es uno de los factores involucrados en el cuadro patogénico.

Para el modelo de **anafilaxia pasiva a nivel sistémico (PSA)** ensayamos dos tipos de antígenos, uno homólogo con albúmina bovina (BSA-antiBSA), y otro heterólogo con endotoxina de *Brucella* (EDTX) y suero de conejo antiEDTX, aprovechando la capacidad sensibilizante de esta molécula (en su fracción 5, según DIAZ y BOSSERAY, 1974). Como mencionamos en el capítulo de Resultados (Fig. 17), el cuadro producido por BSA-antiBSA precisó de dosis mayores de antígeno y desarrolló una presentación clínica más insidiosa, por lo que se seleccionó el modelo EDTX-antiEDTX.

En este modelo PSA tuvimos en cuenta las variaciones de la respuesta en función de la **estirpe murina**; estudios realizados previamente (PORTOLES y col.; 1986) demostraron la ventaja de utilizar ratones BALB/c y el hecho de que esta estirpe tenga, según corresponde a su genotipo H-2, un nivel de Complemento más elevado para su intervención en el aclaramiento de inmunocomplejos de pequeño tamaño (Ag 3/Ag 2), hace que presenten una mayor resistencia al shock anafiláctico por inmunocomplejos (Fig. 15). También, en el estudio comparativo de la reacción PSA realizado con varias cepas de ratones, incluimos el fenotipo C3H que ha demostrado una mayor resistencia a la acción de la EDTX (Tabla VII); este hecho, junto con el desarrollo de un cuadro clínico característico, nos permite asegurar que nos hallamos ante un fenómeno anafiláctico provocado por EDTX, y no ante un shock endotóxico propiamente dicho (DIAZ y BOSSERAY, 1974).

La muerte de los animales se produce durante la primera semana en una fase de espasmo generalizado, según los síntomas clásicamente descritos por SPINK y ANDERSON en 1954, con erizamiento piloso, aumento del ritmo respiratorio y secrecciones abundantes en nariz y conjuntiva e incluso diarrea, en ocasiones, adoptando una postura típica.

Para valorar de un modo más objetivo la gravedad del cuadro anafiláctico, se utilizaron dos parámetros, el índice de mortalidad y el TL_{50} , que como se explica en el capítulo de métodos, nos da una idea más precisa de la agresividad del cuadro clínico.

Hemos observado que distintas **proporciones antigénicas** originan cuadros de diversa naturaleza; así, utilizando "*in vitro*" dos relaciones diferentes de Ag/Ac se produce la formación de inmunocomplejos de características diferentes. Cabe pensar, de acuerdo con COCHRANE y KOFFLER (1973), que en las situaciones de exceso de antígeno (relación Ag 3/Ac 2) se producen inmunocomplejos pequeños, de aclaramiento rápido y con activación marcada del Complemento; mientras que en la situación contraria (Ag 0.25/Ac 1) se forman IC grandes que se precipitan rápidamente, con escasa activación del Complemento (Fig. 14). Diferencias de esta naturaleza son importantes también en los mecanismos de liberación de las aminas vasoactivas y del factor activador plaquetario (FAP), que participan en la patología de enfermedades por inmunocomplejos (NEUWELT y CLARK, 1978).

Es evidente que las proporciones obtenidas "*in vitro*", no se mantienen exactamente cuando se provoca este cuadro en el animal, pero hemos comprobado el desarrollo de un cuadro clínico diferente en cada una de las dos situaciones extremas. En la reacción PSA con exceso de anticuerpo (Ag 0.25/Ac 1) se produce un cuadro clínico más agresivo, con un TL_{50} más corto y un índice de mortalidad mayor, esto es reflejo de una patología diferente, en la que posiblemente está implicada la no participación del Complemento.

Los datos obtenidos en el tratamiento con **Suramina**, un inhibidor del Complemento,

apoyan esta hipótesis. En efecto, el tratamiento no produjo apenas cambios en el caso de exceso de anticuerpo (Ag 0,25/Ac 1), mientras que aumentó la agresividad del cuadro en el caso de exceso de antígeno (Ag 3/Ac 2), al bloquear el Complemento, reduciendo las diferencias entre las presentaciones clínicas de ambos cuadros (Tabla IX).

Se ha estudiado esta reacción en diferentes **razas** de ratones y para diferentes **edades** (Fig. 16), seleccionando ratones BALB/c de 8 semanas, ya que los individuos de mayor edad han demostrado una disminución de actividad inmune que podría interferir en el estudio. Estos modelos, basados en la formación de inmunocomplejos, son fundamentales para estudiar mecanismos patogénicos de lesiones vasculares (DIXON y col.1961; KNIKER y COCHRANE, 1968) y permiten una mejor integración y control farmacológico clínico de distintas enfermedades (COCHRANE y KÖFFLER, 1973; WILLIAMS, 1980). No se conoce bien el mecanismo por el cual el sistema de histocompatibilidad H-2 está relacionado con el nivel de Complemento, aunque sí se sabe que el haplotipo H-2k tiene niveles de C4 y de C3 más elevados que los H-2d (FERREIRA y NUSSENZWEIG, 1975) y que existen diferencias entre el locus S5 del H-2 que influyen en los niveles séricos de C4 (DEMANT y col.1973).

Dentro de este modelo de anafilaxia se realizaron dos modalidades de ensayo: en una de ellas, se produce la reacción PSA en un individuo previamente estresado y en la otra se induce una situación de estrés en un individuo previamente sensibilizado, antes de desencadenar la reacción anafiláctica.

Se ha trabajado, preferentemente, bajo la hipótesis de que la hipersensibilización precede al estrés, por considerarla de presentación más frecuente fuera del campo de la experimentación. Hemos pretendido, con estas dos versiones experimentales, encontrar diferencias atribuibles a la existencia de una **comunicación bidireccional entre los sistemas neuroendocrino e inmune**, tal y como demostró TORRES-ALEMAN y col (1987) en ensayos "*in vitro*" con esplenocitos estimulados por mitógenos.

En efecto, si recordamos lo referido en el capítulo de Introducción, existen evidencias experimentales de esta comunicación bidireccional, que siguiendo la revisión de WEIGENT y BLALOCK (1987) pueden resumirse en cuatro puntos: a) las células incompetentes pueden sintetizar hormonas peptídicas neuroendocrinas biológicamente activas; b) poseen receptores específicos para péptidos opioides y para otros péptidos; c) esos mediadores son capaces de modificar la respuesta inmune; y d) se han localizado receptores para linfoquinas en el SNC, y también marcadores de membrana, que son similares a los de determinadas células inmunológicas.

En nuestro modelo, al igual que en el de KANETA y cols. (1984), se ha observado que el máximo de respuesta dependía, en cierta medida, de la dosis del antígeno desencadenante del shock y del intervalo de sensibilización. Es posible que esto se deba al tipo de inmunocomplejo formado, y de aquí nuestro especial cuidado en seguir un protocolo experimental perfectamente normalizado.

En cuanto al modelo de **reacción anafiláctica cutánea (PCA)**, se ensayaron igualmente ambos sistemas antigénicos, seleccionándose en este caso, la reacción homóloga BSA-antiBSA en la modalidad de sensibilización completa de la piel, tal y como propone OVARY (1958); de este modo obtuvimos lesiones cutáneas más fácilmente valorables, según queda reflejado en el capítulo de Resultados (Fig. 20).

También, en el estudio de este modelo, se valoraron diferentes parámetros de intervalo y secuencia del proceso experimental, seleccionando finalmente: inyección i.v. de suero antiBSA para, a los 4 días, inyectar el antígeno intradérmicamente y después hacer la lectura de la lesión dérmica a los 10 días, valorando la respuesta en función del diámetro de la lesión expresado en mm. Este modelo es semejante, en cuanto a posibilidades, al clásico modelo de PCA propuesto por MOTA y WONG (1969), utilizado también para estudios de modulación farmacológica de Ig E por BAKER y cols (1981) (Figs. 18, 19 y 20).

En nuestro caso se estudiaron diferentes **razas de ratones** seleccionando, una vez

más, la estirpe BALB/c, por presentar una lesión dérmica más fácilmente valorable, para una dosis menor de Ag. En los ensayos posteriores, se utilizaron dos tipos de sensibilización: una sistémica, con inyección i.v. de BSA, y posterior administración subcutánea del anticuerpo; y otra local, con administración de ambas sustancias en un área dérmica concreta. De este modo intentamos buscar algunas diferencias fisiopatológicas que aportasen más datos sobre la interacción neuroinmune (Figs. 18, 19 y 20).

Para completar el estudio de los modelos seleccionados, con vistas a los ensayos posteriores, se estudiaron las **variaciones de los parámetros inmunológico y de estrés**, en el desarrollo de ambas reacciones PSA y PCA. Así, hemos comprobado que las variaciones en los **niveles de corticosterona**, un indicador bioquímico de estrés, son poco significativas a lo largo de ambos cuadros, aunque se ha detectado un aumento en las manipulaciones iniciales del modelo de PSA, que disminuye al originarse la reacción anafiláctica completa, reflejo posiblemente del inicio de una situación de fracaso orgánico (Fig. 21). En el caso de la anafilaxia cutánea (PCA), la inyección inicial del antígeno disminuye levemente los niveles séricos de corticosterona, con una elevación de los mismos al provocarse dicha reacción anafiláctica cutánea, como expresión de un cierto grado de estrés producido en el animal por los síntomas locales de dicha reacción (Fig. 22).

Las variaciones en los distintos parámetros (recuento de plaquetas y eosinófilos, respuesta blastogénica intrínseca y mitógeno inducida, liberación de IL-2 y actividad NK), completan el estudio del modelo, y sirven de control de referencia frente a los obtenidos en situaciones de estrés. Se ha observado un aumento en el recuento de eosinófilos, como era de esperar en una reacción anafiláctica, y una disminución en el número de plaquetas, posiblemente por consumo o destrucción de las mismas. Previamente, comprobamos en los grupos control y antes de cualquier tratamiento, que las cifras de eosinófilos y

plaquetas eran correspondientes a las indicadas por SCHALM y cols (1985) para la especie murina utilizada (Fig. 26).

El resto de parámetros inmunológicos, se resumen en las figuras 23, 24 y 25. Llama la atención el aumento de la **blastogénesis intrínseca** en el modelo de PSA con EDTX de *Brucella abortus*, que muestra un incremento de, aproximadamente, cuatro veces a las 2 horas; mucho mayor que el producido por endotoxina de *E.coli* (Fig. 23), probablemente debido a un mayor efecto mitogénico intrínseco de la propia EDTX, y que va disminuyendo al avanzar el tiempo. Este efecto queda enmascarado al estudiar la respuesta a mitógenos (ConA y LPS), debido a una interacción competitiva entre estas, que se produce posiblemente a nivel de receptor. El efecto activador de la EDTX sobre las células ConA sensibles, se confirma al estudiar la producción de IL-2, aunque en este caso, la respuesta es más tardía, siendo patente a las 6 horas. El modelo BSA-antiBSA mostró para todos los casos una inhibición de intensidad variable.

También hemos constatado una depresión ejercida inicialmente sobre células **NK** (respuesta del 78%), que va normalizándose progresivamente a lo largo del tiempo (Fig. 25).

En el **estudio de las situaciones de estrés**, era necesario desarrollar un modelo experimental adecuado, para lo cual llevamos a cabo una selección de los empleados por otros autores, eligiendo aquellos que parecían menos cruentos, y más fácilmente normalizables. Los modelos seleccionados respondían a diferentes tipos de estímulos: a) de tipo psicosocial en los de aislamiento (AIS) y hacinamiento (HAC); y b) con un condicionante físico para el de inmovilización (INM). Realizamos un estudio preliminar para la selección del modelo, valorando tanto el nivel de estrés alcanzado, como las alteraciones inmunológicas básicas producidas. Por otra parte, se seleccionó un modelo de estrés producido por la administración continuada de morfina (MFN), cuyo efecto químico-tóxico alcanza el SNC y condiciona diversas alteraciones fisiopatológicas. Este modelo,

previamente desarrollado en nuestro departamento (LORENZO y cols. 1987), ofrecía la posibilidad de un manejo farmacológico con agonistas y antagonistas, a la vez que implicaba a receptores situados a nivel neuronal y de células inmunocompetentes (SIBINGA y GOLDSTEIN, 1988).

Las respuestas a las distintas situaciones de estrés, que en teoría podían presentar una cierta similitud, produjeron distintos niveles de respuesta bioquímica, ya que las variaciones de corticosterona sérica en las situaciones de aislamiento y hacinamiento, eran de mucha menor intensidad y duración que en el caso de inmovilización y morfíno-dependencia. Dado que los niveles de corticosterona son variables para los distintos lotes de animales, aún en condiciones normales (15.7 ± 1.05 hasta $38,6 \pm 1.9$) se usaron siempre controles paralelos en cada situación expresando los resultados en % de respuesta control.

Aplicando el modelo de **inmovilización (INM)** se consiguió alcanzar un nivel de estrés más acusado, tanto por el estudio de comportamiento, como por el bioquímico (Fig. 12), con niveles de corticosterona (COR) claramente superiores. En los cuadros de **morfíno-dependencia (MFN)** se elevaron aún más los niveles de corticosterona plasmática (Fig. 13). Ambos modelos presentaban los valores más extremos para los parámetros de comportamiento: tensión muscular, intranquilidad, y actividad motora; en tanto que el modelo de MFN presentaba asociado, además, un elevado grado de analgesia (Tabla VI). BAYER y FLORES (1991) han observado que la simple inyección de morfina (25 mg/Kg) es capaz de elevar seis veces el nivel de corticosterona en las dos primeras horas, atribuyendo a este glucocorticoide el fenómeno inmunodepresor de la respuesta blastogénica.

En los estudios inmunológicos realizados para comparar las alteraciones debidas a los tres modelos preseleccionados, el de INM demostró ser capaz de producir una inmunodepresión más marcada globalmente considerada. Así, observamos una importante

disminución en el número total de células esplénicas, que quedan reducidas tras una semana de inmovilización al 25% de lo normal (Fig 27).

Se ha constatado una depresión en la blastogénesis, que es más marcada en todos los casos para el modelo de INM, particularmente para células ConA sensibles (42% respecto al control), y que parece de muy escasa cuantía en los modelos de AIS y HAC (Fig 28 y 29). Estas alteraciones parecen corresponderse con los niveles más elevados de corticosterona, que reflejan un grado de estrés mayor. Más adelante, y para evitar repeticiones, discutiremos detalladamente las alteraciones inmunes producidas en situaciones de estrés por inmovilización, modelo que fue seleccionado finalmente, junto con el de morfinodependencia, que también se incluye en este estudio por sus peculiares características antes reseñadas.

El método de **inmovilización** aquí descrito, constituye un interesante modelo de estrés en ratón que es fácilmente normalizable, de escasa agresividad, y con una variabilidad en los parámetros de comportamiento y bioquímicos, que demuestra un grado de estrés superior al provocado por los otros dos modelos. Asimismo, se objetivan unas alteraciones inmunológicas más marcadas y que justifican su selección para un estudio detallado.

Con el modelo de **morfinodependencia** se alcanza un nivel de estrés aún mayor, poseyendo además las especiales características señaladas anteriormente, por lo que también fue seleccionado para completar su estudio en lo relativo a interacción neuro-inmune. A pesar de que gran parte de los ensayos inmunológicos se realizaron en los cuatro modelos, como se cita en el capítulo de Resultados, tan solo se discutirán aquellos resultados obtenidos en los dos modelos finalmente seleccionados de inmovilización y morfino depenencia.

V.2.- ALTERACIONES INMUNOLOGICAS PRODUCIDAS POR ESTRES EN EL MODELO DE INMOVILIZACION.

Al considerar detalladamente las modificaciones observadas en la respuesta inmune a consecuencia de una situación de estrés por inmovilización, parece adecuado revisar en primer lugar aquellas alteraciones de los ensayos "ex vivo", y posteriormente las alteraciones correspondientes a los modelos de anafixia experimental.

Así, hemos observado una disminución de la actividad mitogénica intrínseca de los esplenocitos, produciéndose una depresión máxima a la 24 horas de finalizar el estrés (80% respecto al control), seguida por una normalización progresiva. Estas alteraciones parecen reflejar, aunque con cierto retraso, las alteraciones en los niveles de corticosterona detalladas en la figura 12, que mostraba un aumento máximo a los 30 minutos de finalizar el estímulo, manteniendo los niveles a las 24 horas, con una tendencia progresiva hacia la normalización. Sin embargo, cuando se mantiene el agente estresante durante otro ciclo semana, no se potencia esta depresión de la respuesta blastogénica (Fig. 30).

Al estudiar los diferentes grupos celulares, observamos que la actividad de las células T resultó ser la más afectada. En efecto, la mitogénesis ConA inducida presenta una depresión máxima (de aproximadamente el 50%) a los 30 min, que cede parcialmente en la determinación a las 24 h. (55% de respuesta respecto al control), y que posteriormente, va aproximándose al valor de referencia con una depresión del 30% en la última determinación (Fig. 29); estas modificaciones discurren inversamente a la de los niveles de corticosterona, como puede verse comparando con los datos de la Fig. 12. Cuando se estudia esta respuesta en función del tiempo que se mantiene el agente estresante y de la dosis de mitógeno, se observa que con dos semanas de inmovilización, se produce un aumento en la inhibición, que es aún más marcada para las dosis bajas de

mitógeno. Al aumentar la dosis de mitógeno de 1 a 3 $\mu\text{g/ml}$, disminuye la diferencia con el control en la segunda semana (Fig. 30), correspondiéndose con un nivel más bajo de corticosterona (Fig. 32).

Con el propósito de obviar, en lo posible, la interacción entre células B y T en las pruebas de proliferación, hemos ensayado la respuesta frente al **anticuerpo monoclonal 2C11**. Este reactivo presenta una gran especificidad para las células T que expresen el receptor CD3- ϵ , que participa en la trasducción de señales de activación a través de membrana (OBERDAN y col.1987), que se usa en estudios de inmuno-regulación "*in vivo*", y que podría tener una aplicación clínica en la modulación por fármacos. Con dicho anticuerpo 2C11 hemos comprobado un comportamiento similar, al que se observa en presencia de Con A, aunque presentando una inhibición más marcada en la primera semana, cuando existe un nivel mayor de corticosterona sérica, y sin que se observen modificaciones al incrementar las dosis de 2C11 (Fig. 30). El último parámetro analizado en relación con los linfocitos T, es la actividad de IL-2 que presenta una curva parecida a la de la mitogénesis intrínseca, con depresión inicial, que es máxima a las 24 h, y una recuperación casi total a los 6 días.

Por tanto, parece claro que el estrés producido por INM provoca una inmunodepresión más marcada sobre los linfocitos T, y que se corresponde bien con los niveles de corticosterona sérica (índice bioquímico de estrés) como queda demostrado en los párrafos precedentes. Tanto los estudios de seguimiento en función del tiempo transcurrido desde la finalización del estrés, como los realizados con un tiempo más prolongado de estrés (2 semanas) con diferentes mitógenos (Fig. 28, 29 y 30), muestran una buena correspondencia con el nivel bioquímico de estrés (Fig. 12 y 32). La producción de IL-2, parámetro indirecto de actividad de linfocitos T, refuerza esta hipótesis, al presentar una disminución en la producción de dicha interleuquina que se corresponde con los niveles de corticosterona, aunque en este caso, presenten su máxima alteración en un

tiempo más prolongado.

Es posible que esta inmunodepresión inicial tan intensa esté vinculada a la intervención del factor activador de plaquetas (FAP) liberado durante las primeras horas de la reacción anafiláctica, puesto que según demostraron BRAQUET y col. (1987), el FAP interviene en la regulación de la blastogénesis PHA-inducida "in vitro".

La actividad de los **linfocitos B**, valorada por la respuesta proliferativa frente a LPS, presenta una inhibición menos marcada que la de los linfocitos T, alcanzando una depresión del 22% que, progresivamente, va normalizándose al ir disminuyendo los niveles de corticosterona. Si consideramos las Figs. 28 y 12, observamos una relación inversa entre corticosterona sérica y mitogénesis LPS-inducida. En el caso de mantener durante dos semanas la situación de INM, los niveles de COR se mantienen significativamente elevados con respecto a los niveles normales, mientras que la inhibición sobre células B no sólo se mantiene sino que incluso, llega a aumentar ligeramente. Creemos que la depresión de células B es consecuencia en parte de la alteración en la células T: En efecto, los ensayos de proliferación se realizan sobre poblaciones linfocitarias no discriminadas, de forma que no pueden descartarse interacciones entre ellas.

BENNER y Van OUDENAREN (1979), observaron una inhibición de las células formadoras de anticuerpos (CFP) frente a LPS de *E. coli*, que era inducida por corticosterona en bazo de ratones; mientras que en medula ósea, el fenómeno era inverso, y se reflejaba por aumentos dosis dependientes de esta respuesta. Dichos autores suponen que este efecto contradictorio sobre esplenocitos y células medulares, puede ser debido a una redistribución de las células B que emigran del bazo para acumularse en la medula ósea.

La **lisis no activada por anticuerpos**, implicada en los mecanismos de vigilancia inmunológica (HEBERMAN y ORTALDO, 1981), es debida a la actividad de células NK (Fig. 35), y resulta igualmente afectada, con una inhibición que aumenta en la segunda

semana de estrés, y con unos niveles de COR que se mantienen elevados en ese momento (Fig. 32). Según las investigaciones de ONSRUD y THORSBY (1981) en humanos, mediante la administración de 300 mg de hidrocortisona, se comprueba que el efecto del fármaco es variable, puesto que aparece incrementada la actividad lítica de las células NK frente a las células diana K-562 durante las 4 primeras horas, se inhibe a las 24 horas, y vuelve a la normalidad al cabo de 48 horas. Para estos autores, el efecto puede ser debido a una redistribución reversible de la cortisona que afecta a otras células sintetizadoras de mediadores capaces de actuar sobre las células NK.

En nuestro caso, las variaciones encontradas no pueden ser reflejo de un efecto redistributivo, al persistir la COR elevada durante un tiempo más prolongado, porque el efecto inmunodepresor se mantiene. Si tenemos en cuenta los resultados de KATZ y col (1985), sobre la independencia de los receptores de corticoides y la actividad citotóxica de las células NK, cabe pensar que el efecto puede deberse a una participación de otros factores que contribuyen a deprimir aún más la actividad de **lisis específica sobre células YAC-1**. Entre estos factores se encuentran la activación del eje hipófiso-adrenal, o un aumento en la actividad simpático-adrenal, consecuente con el proceso psicológico desencadenante de la situación de estrés (IRWIN y col.1987). Esta sensibilidad de las células NK, contrasta con la resistencia a corticosteroides presentada por las células citotóxicas mediadas por anticuerpos (CCAD), (PARRILLO y FAUCI,1978).

El subgrupo considerado en el capítulo de Resultados, como inmovilización con **posibilidad de autoliberación**, presenta un nivel de COR mayor, que no se corresponde con una inmuno-depresión más acusada. Así, los valores de mitogénesis son similares a los del grupo INM, o incluso más próximos al control, en el caso de mitogénesis intrínseca, o LPS-inducida (Fig. 34). Es posible que la fiabilidad del modelo de autoliberación sea menor que la del clásico modelo de INM, ya que es más difícilmente normalizable, puesto que son más patentes las diferencias de tipo individual (BOHUS y col. 1987), y no puede predecirse

con exactitud cuánto tiempo tardará en liberarse. Por este motivo, no se continuaron estudios posteriores con esta variación del modelo inicial.

Por último, en las situaciones de inmovilización habituales, se detectó una disminución en el número de **eosinófilos** circulantes. La escasa literatura sobre este grupo celular hace que no se atribuya una explicación al fenómeno, aunque estos valores son utilizados como referencia para estudios posteriores sobre anafilaxia (PSA) (Fig. 36).

En cuanto a los estudios "*in vivo*", se realizaron en los modelos PSA y PCA. En el primero de ellos, se emplearon las dos proporciones de Ag/Ac mencionadas previamente, desarrollándose en dos secuencias distintas: en un caso, se provocaba una reacción PSA en animales sometidos a inmovilización durante una semana. En el otro supuesto, se inmovilizaba a animales previamente sensibilizados provocando finalmente la reacción PSA. De este modo estudiamos la interacción neuro-inmune de un modo bidireccional. Este modelo permite comprobar los efectos del estrés sobre el fenómeno anafiláctico, a la vez que nos sirve de ensayo "*in vivo*" del funcionamiento del sistema inmune.

Al estudiar el desarrollo de la reacción **PSA en ratones sometidos a estrés por inmovilización**, observamos para la proporción Ag 0.25/Ac 1 un alargamiento espectacular del TL_{50} que pasó de 4 a 7 horas, con un discreto descenso de la mortalidad hasta el 83% del control. Esto refleja un curso clínico más solapado y con una letalidad levemente alterada. Sin embargo, para la proporción Ag 3/Ac 2, el fenómeno es diferente, objetivándose un discreto alargamiento del TL_{50} , que pasa de 14,7 a 20,6 horas, y una marcada disminución de la mortalidad, que queda en el 41,6% del control; lo que podría ser la expresión de un cuadro con una patocronia similar, aunque de menor letalidad (Fig. 45). Esto refleja, una vez más, una **alteración global del sistema inmune**, incapaz de desarrollar una reacción anafiláctica adecuada. Las diferencias entre ambos patrones están en relación con la participación o no del sistema de Complemento, tanto en las posibilidades de eliminación de IC en función de su tamaño (COCHRANE, 1984), como por

la naturaleza endotóxica del antígeno que puede activar al Complemento por la vía clásica o alternativa (FINE,1974; MORRISON y KLINE,1977); o por el contrario llegar a inhibirlo a través del factor C₃ (BEUSCHER y BRADE,1986).

En el caso del ratón **hipersensible sometido a situaciones de estrés**, la respuesta para la proporción Ag 0,25/Ac 1 es similar a la descrita previamente, aunque con diferencias cuantitativas (Fig. 44). La relación Ag 3/Ac 2 presenta una modificación muy discreta del TL₅₀ (de 16,5 a 19,2 horas), con una disminución de la mortalidad al 50% del control y que, posiblemente, refleja tan sólo variaciones de tipo individual frente al estrés.

Por tanto, el modelo de PSA con **exceso de anticuerpo (Ag 0,25/Ac 1)** es más sensible a la inmunodepresión provocada por la INM, independientemente de que utilicemos una u otra secuencia temporal (animales estresados que sufren PSA, o ratones sensibilizados que padecen estrés). Esta disminución de actividad del sistema inmune, se refleja de modo cuantitativo en los parámetros de TL₅₀ y mortalidad.

En el modelo de PSA con exceso de antígeno (Ag 3/Ac 2) se afecta más claramente la mortalidad, con una alteración menor del otro parámetro TL₅₀. Estas variaciones obtenidas para ambos modelos de PSA y en función de la proporción Ag/Ac empleada, puede ser la expresión clínica de una fisiopatología diferente según participe o no el Complemento, en consonancia con los resultados obtenidos en estudios de precipitación "*in vitro*" para diferentes proporciones Ag/Ac.

La inmunodepresión producida por la inmovilización, fue capaz de anular la elevación del número de **eosinófilos**, que es característica de la reacción PSA; esto puede ser una consecuencia de la elevación del nivel de corticosterona en suero, que origina un fenómeno semejante al ya observado por MURRAY y cols (1950) al inyectar cortisona o ACTH en cobayos hipersensibilizados con BSA. En ningún momento hemos observado que la situación de estrés por inmovilización afectara al número total de plaquetas.

La inmunodepresión provocada por una situación de estrés en el modelo de INM

se expresa por una modificación en la presentación de los cuadros de PSA, y se supone debida a las alteraciones observadas previamente en los estudios de actividad celular "ex vivo". El grupo celular más alterado en dichos ensayos fue el de los linfocitos T, como se constató por los estudios de mitogénesis ConA-inducida, respuesta a 2C11, y capacidad de síntesis de IL-2. Para comprobar esta hipótesis y descartar otros factores de regulación al interactuar ambos modelos de estrés, realizamos ensayos en esplenocitos procedentes de ratones en situaciones de estrés. En cuanto a estos **parámetros de actividad celular**, la estimulación mitogénica que habíamos descrito en la reacción PSA, posiblemente debida a efecto directo de la EDTX, desaparece al provocar la situación de estrés, produciéndose una disminución muy acusada de esta respuesta. Esta alteración mitogénica se refleja, tanto a nivel de los linfocitos T como de los B; aunque una vez más, los primeros resultan más susceptibles. Así, en el estrés debido a la inmovilización, se produce una disminución de la mitogénesis inducida por ConA y de la actividad de IL-2 (Fig 49), previamente estimuladas por la reacción PSA (Fig. 23 y 24). La actividad de las células NK, previamente inhibidas por la reacción PSA, sufren una inhibición aún mayor.

Todas estas alteraciones se corresponden con una marcada elevación de la corticosterona sérica, producida al añadir una situación de estrés (INM) a la reacción anafiláctica que se utiliza como determinante inmunológico.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos afirmar que el cambio producido por la inmovilización en la presentación clínica del shock anafiláctico es debido, fundamentalmente, a una disminución en la actividad en los **linfocitos T**, principales reguladores de la respuesta inmune, así como a una disminución del número de **eosinófilos**, grupo celular implicado en la patogenia del cuadro.

Al estudiar las variaciones debidas a la **inmovilización (INM) en la reacción cutánea PCA**, se utilizaron dos tipos de sensibilización, indicadas como de **piel completa** y de **reacción local**. Las alteraciones objetivadas fueron mucho mas claras en el primer

modelo, ya que al implicar a todo el organismo, el sistema resulta más sensible a los cambios debidos a la comunicación neuroinmune. Así, como se observa en la Fig. 46, el valor medio de la lesión pasa de 6 a 3.8 mm, con una disminución del 60% respecto al control, para estos casos de sensibilización en piel completa.

V.3.- VARIACIONES EN LA RESPUESTA INMUNE DE RATONES SOMETIDOS A SITUACIONES DE ESTRES POR MORFINODEPENDENCIA.

En este modelo, la inmunomodulación resulta más compleja de interpretar que en los casos anteriores de inmovilización (INM), puesto que nos encontramos con varios mecanismos posibles de regulación. Podemos sugerir tres mecanismos básicos para explicar los **efectos de la morfina sobre los linfocitos**: **a)** efecto directo sobre dichas células, a través de receptores específicos; **b)** efecto indirecto a través de otras células implicadas en la respuesta inmune; y **c)** efecto mediado por el SNC a través de mecanismos neuroendocrinos o del sistema nervioso autónomo (SNA). Existen evidencias en la literatura que apuntan a favor de los tres mecanismos (BAYER y FLORES, 1991).

Para analizar y discutir los resultados obtenidos en este modelo, seguiremos un esquema similar al utilizado previamente para la inmovilización. Como vimos en el estudio preliminar de los modelos, la morfina dependencia conlleva un **nivel bioquímico de estrés** más elevado que la inmovilización, presentando en la segunda semana, una diferencia aún más acusada. Otros autores han descrito igualmente aumento en los niveles de ACTH y prolactina, (BRYANT y col. 1988, 1988c). Sin embargo, como veremos más adelante, el efecto sobre el sistema inmune no es solo cuantitativamente diferente. Si comparamos estos resultados con los que aparecen en la Fig. 28, observamos cómo la inmunodepresión alcanzada se corresponde con el nivel de estrés, aunque existe en la literatura actual una interesante controversia sobre el papel de la morfina en esta

inmunodepresión.

Se ha demostrado que algunos de los efectos de MFN y otras sustancias opioides sobre células de sistema inmune se producen por un mecanismo directo, quizás a **nivel de receptores** en dichas células (MADDEN y DONAHOE, 1991). Sin embargo, para algunos autores como BAYER y FLORES (1991) parte de los efectos de la morfina se deberían al desarrollo de una **situación de estrés**, con un aumento de COR que justificaría la inmunodepresión comprobada e incluyendo este efecto de la MFN dentro de un amplio marco que engloba al eje neuroendocrino (MOREY y col., 1971).

En los estudios de actividad celular específica, hemos constatado una **mayor afectación de las células T**, respecto de las B. Sin embargo, si comparamos con el modelo de INM esta inmunodepresión es en conjunto mayor, correspondiéndose con un nivel mayor de COR. Una vez más, la actividad de células T fue valorada por mitogénesis ConA-inducida. En cuanto a la producción de IL-2, se observa una depresión hasta el 58% de actividad que se mantiene a las 24 horas (Fig. 33). Este modelo presentó la depresión máxima en la respuesta a ConA, alcanzando hasta un 22% de la respuesta control, para mostrar posteriormente una tendencia hacia la normalización (Fig. 30). En este caso, la máxima inhibición se produjo a las 24 horas, a diferencia de lo ocurrido en la INM que mostraba el máximo a los 30 minutos. Esto parece ser debido a que la supresión del estrés en el modelo INM es inmediata, mientras que tras retirar el "*pellet*" de morfina, persisten niveles circulantes de esta sustancia, por lo que no se consigue una desaparición inmediata del agente estresante.

En la literatura se ha descrito un **efecto directo sobre los linfocitos T**, reflejado en la respuesta a ConA tras la administración de una dosis única de morfina, que parece ser dosis dependiente, y que coincide con el nivel máximo de biodisponibilidad de morfina (BAYER y FLORES 1991). Esto hablaría en favor de un efecto mediado por receptores opioides; sin embargo, este efecto no es revertido por Nx, y como hemos comprobado en

este trabajo, se mantiene también en administraciones crónicas de MFN, no coincidiendo necesariamente con un nivel sérico máximo de la droga (BRYANT y col. 1988c), pareciendo correlacionarse con niveles más elevados de COR.

Todo ello hablaría en favor de un **efecto a nivel central (a partir del SNC)**, secundario a la situación de estrés provocada. Como veremos al hablar de actividad NK, hay otras evidencias en la literatura de que se precisa la integridad del eje hipotálamo-hipofisario (HPT-HPF) para que se produzcan ciertos efectos inmunodepresores de la morfina. Existen igualmente, otros trabajos que indican que algunos efectos de la morfina sobre linfocitos T pueden ser revertidos manipulando el eje neuroendocrino (BRYANT y col. 1988a). En los ensayos con dos semanas de morfinodependencia se observó una inmunodepresión mayor, que se acompañaba de niveles menores de COR (aunque siempre muy superiores a los controles). Este efecto sería explicable por los niveles elevados de COR (reflejo del estrés) mantenidos durante un tiempo mayor, aunque la determinación puntual al término del ensayo sea algo menor.

La actividad de los **linfocitos B**, que en el modelo de INM mostraba una ligera disminución (respuesta del 78% respecto al control), se encontraba más claramente deprimida en este modelo. Como se ha podido ver en la figura 29, la respuesta a LPS disminuyó hasta el 66% respecto al control. Una vez más, observamos la misma relación temporal con el mínimo de respuesta a las 24 horas. La mayor afectación de las células B, en este modelo, no se corresponde a una pérdida de selectividad celular en el efecto inmunodepresor del estrés, sino con una depresión más acusada en todos los grupos celulares. Para algunos autores, este efecto sobre la respuesta humoral se debe más a la disminución de las funciones de linfocitos T, o de otras células intermediarias en su cooperación con las células B, que a un efecto directo sobre estos linfocitos (WEBER y col. 1987). Esto concuerda con nuestros resultados, puesto que las mitogénesis se inducen sobre grupos celulares purificados en conjunto, utilizando como factor de discriminación

la selectividad del mitógeno empleado (ConA o LPS), pero sin excluir del cultivo las células T, que al verse funcionalmente deprimidas, pueden interferir indirectamente la mitogénesis de las células B, en el proceso de cooperación T-B.

La actividad de células NK mostró una depresión similar a la observada en el modelo de INM, aunque existe alguna evidencia en la literatura sobre un efecto NK estimulante en esplenocitos aislados en caso de una administración intensa y puntual de MFN (SHAVIT y col. 1985); sin embargo, la administración mantenida durante 4 días produce una disminución en la respuesta citotóxica por células NK. Este último fenómeno es dosis dependiente, saturable, estereoespecífico, y reversible por naloxona "*in vitro*"; ello apunta claramente a un efecto dependiente de receptores situados en las células inmunocompetentes (SHAVIT y col 1986). Otros autores han demostrado la necesidad de un eje hipotálamo-hipofisario (HPT-HPF) intacto para que la morfina administrada induzca al SNC, a producir este efecto sobre las células NK (SHAVIT y col 1986a).

En nuestro estudio, la inducción de un síndrome de abstinencia con Nx, que aunque conlleva un mayor estrés, implica simultáneamente un efecto antagonista de MFN a nivel receptores específicos, se asocia a una mayor depresión de estas células citotóxicas. No obstante, si valoramos los resultados tras dos semanas de estrés, esta correlación entre COR y depresión NK, no se mantiene claramente. En efecto, si consideramos los resultados de las figuras 32 y 35, no podemos establecer una correlación directa entre los niveles de corticosterona y la actividad NK. Estos resultados, implicarían una regulación más compleja para este grupo celular, en la que participarían, tanto elementos receptoriales de las propias células, como factores de un nivel superior correspondiente a una regulación neuroinmune (IRWIN y col.1987; KATZ y col. 1985).

En cuanto a la repercusión sobre otros grupos celulares implicados en reacciones de anafilaxia, **los eosinófilos** sufren una inhibición máxima en las situaciones de morfíno-dependencia, presentando el recuento celular más bajo de todos los modelos;

mientras que el número de **plaquetas** se eleva discretamente, aunque estas pequeñas variaciones podrían carecer de significación clínica. Existe alguna evidencia de que las plaquetas humanas podrían tener receptores opioides, pero estos datos no están aún suficientemente contrastados (MEHRISHI y MILLS 1983).

Cuando estudiamos el desarrollo de un **síndrome de abstinencia** mediante la administración de naloxona (Nx), encontramos una brusca elevación de los niveles de COR, reflejo del gran estrés que acompaña al cuadro clínico de este síndrome (Fig. 13). Por este motivo, esperábamos una potenciación de los efectos inmunosupresores observados en los animales morfina dependientes, como se había constatado en la actividad NK (Fig. 35), con una disminución marcada de su actividad coincidente con aumentos en el nivel de COR; sin embargo, esta correspondencia no se mantiene al prolongar la situación durante dos semanas, según se ha comentado previamente.

No pudo comprobarse una clara correlación en todos los parámetros analizados. Así, al considerar los resultados de la **mitogénesis intrínseca** (en PBS), se observa una inmunorrestauración debida a la Nx; efecto que no aparece al añadir Nx al grupo control y que, por tanto, no puede considerarse dependiente de un efecto intrínseco del fármaco. Estos resultados apuntan a que este efecto de la MFN sobre los esplenocitos, podría deberse, al menos parcialmente, a un mecanismo de interacción directa receptor-ligando. En la literatura se encuentran resultados contradictorios sobre este punto, y mientras algunos autores afirman una reversibilidad parcial de este efecto inmunodepresor de la MFN, otros reportan la no reversibilidad con Nx (SHAVIT y col. 1986). En cualquier caso, es necesario continuar estos estudios para aclarar esta interacción.

En la mitogénesis de **células B**, se produce una recuperación de los niveles de respuesta, previamente deprimidos por la MFN, que también se muestra en los grupos control. La respuesta mitogénica de **células T**, valorada por ConA y 2C11, presenta una inmunorrestauración variable, más patente en los ensayos con dosis bajas de mitógenos.

Tan sólo en el caso de ensayos con 1 µg de ConA y una semana de estrés, se pudo demostrar este efecto al administrar Nx a ratones no morfina dependientes, sin que aparezcan diferencias en el resto (Fig. 31); por tanto, no podemos concluir si este efecto es debido a la acción directa del fármaco, o implica otros sistemas de autorregulación.

En los estudios realizados con dos semanas de estrés, quedó patente, una vez más, cómo la Nx disminuía el efecto inmunodepresor de la MFN, especialmente para las células T, no pudiendo demostrarse ningún efecto sobre los grupos control.

En cualquier caso, el sencillo modelo teórico: estrés, seguido de elevación de corticoides, y la consiguiente inmunodepresión, no parece ser la única explicación de nuestros resultados. Nos encontramos con que la Nx provoca un nivel de estrés más acusado y un nivel más elevado de COR; pero que, en contra de lo esperado, se produce una corrección parcial de la inmunodepresión debida a la MFN. Esto hablaría en favor de un efecto directo de la morfina, mediado por receptores opioides, a nivel de células inmunocompetentes y, por tanto, potencialmente reversible por antagonistas específicos en un corto espacio de tiempo.

Es lógico pensar que, en este modelo de estrés, se acumula el efecto de la MFN al del estrés neurologico, con un nivel de COR elevado, tal como quedó demostrado en el modelo de INM; pudiendo existir, además, una acción directa sobre los receptores opioides específicos, que sería antagonizada por Nx. El corto espacio de tiempo transcurrido entre la brusca elevación de COR y las determinaciones celulares, puede explicar la falta de efecto del factor corticoideo. Queda por dilucidar el posible efecto directo de la Nx , puesto que en determinados ensayos, también se han encontrado variaciones en los grupos control tratados.

Los modelos utilizados para la valoración de la **respuesta anafiláctica (PSA y PCA)**, demuestran igualmente una inmunodepresión secundaria a la MFN, que es más acusada que la obtenida en el caso de INM. Para la reacción PSA, seguimos un plan de trabajo

similar al explicado previamente para el modelo de INM, utilizando las dos proporciones Ag/Ac, y las dos secuencias: estrés sobre animal sensibilizado, y anafialxia sobre animal estresado.

Como se explicó en el capítulo de Resultados, las dos secuencias obtuvieron resultados cualitativamente similares (Figs. 44 y 45). Para el **modelo Ag 0,25/Ac 1**, que recordamos se asociaba "*in vitro*" a inmunocomplejos de gran tamaño, de rápida precipitación y con poca participación del Complemento, se constató una atenuación del cuadro patológico, con una prolongación importante del TL_{50} , acompañada de una disminución del índice de mortalidad; lo que refleja una inmunosupresión más acusada que en el caso de INM. En el otro modelo (**Ag 3/Ac 2**), el efecto es sorprendentemente menor que en el caso de INM. Por tanto podemos deducir que el efecto de la morfina sobre el sistema de Complemento es menor, centrando su acción principalmente en las células T.

La **Naloxona (NX)** contrarresta el efecto de la MFN, en lo que se refiere al desarrollo del cuadro con una disminución de los valores de TL_{50} (que llegan a alcanzar la normalidad en el modelo con exceso de antígeno). Sin embargo la mortalidad aumenta en todos los casos colocándose en niveles próximos al control en tres de los cuatro modelos (Figs. 44 y 45).

Los parámetros de inmunidad celular analizados en los animales sometidos a estrés, y para el modelo de PSA establecido, corroboran la inmunodepresión secundaria al tratamiento con MFN (Figs. 46, 47 y 48), mostrando una vez más una afectación mayor a la objetivada en el modelo de INM, con cierta selectividad para los linfocitos T, y siendo válidas aquí, las consideraciones reseñadas en el apartado anterior para similares estudios en el modelo de INM.

V.4.-MODULACION FARMACOLOGICA.

En un doble intento de modular la respuesta inmune y aportar más datos sobre su interacción con el SNC, se ensayaron cuatro grupos de fármacos.

.- **A)** En primer lugar utilizamos fármacos adaptógenos que nos permitieran disminuir el nivel de estrés. Los extractos saponínicos de *Eleuterococcus senticosus* han demostrado en trabajos previos, un incremento de la capacidad de adaptación a situaciones nuevas (BRECKHMANN y DARDIMOV 1969). Tras realizar ensayos para ajustar el tiempo y las dosis usadas por otros autores a nuestro modelo, nos decidimos por una pauta de dos o tres semanas de tratamiento por vía oral, a dosis de 10mg/Kg, haciendo coincidir el estímulo estresante con la última parte del tratamiento. Así, pretendíamos demostrar si el empleo de fármacos adaptógenos permitiría disminuir el nivel de estrés, cuantificar esta variación, y confirmar una corrección de la inmunodepresión obtenida con la inmovilización. Esta tesis ha podido ser comprobada, como se refleja en las figuras 51 y 52, confirmandose una **disminución de los niveles de COR**, que pasan de 51 a 32 $\mu\text{g}/100$ ml. Estos resultados se corresponden con los descritos previamente por PETKOV y col en 1966, al medir variaciones en la producción adrenal tras tratamiento con estas sustancias. A consecuencia de esto, la **respuesta mitogénica de las células T**, deprimida por la INM, aumentó hasta alcanzar prácticamente los valores de referencia en el grupo control; sin embargo, el tratamiento sobre el grupo no estresado, no produjo cambios en dicha actividad celular, por lo puede descartarse un efecto intrínseco del fármaco sobre esta población celular. El efecto sobre los linfocitos B fue menor, del mismo modo que fue menor aún el efecto de la INM sobre las células procedentes de ratones así tratados.

En los estudios de **respuesta anafiláctica**, según la pauta descrita en el capítulo de Resultados, se ha confirmado una restauración de esta respuesta, que alcanza prácticamente los valores de los animales no estresados (en TL_{50} y mortalidad). Esto

parece debido efectivamente a la disminución del estrés, con descenso en los niveles de COR, y consecuente recuperación de la actividad de linfocitos T y eosinófilos. Las diferencias para las dos proporciones de Ag/Ac son de escasa importancia, como cabe esperar de un tratamiento que actúa en la rama aferente del estrés, y que por tanto tiene escaso efecto a nivel del Complemento.

El **modelo de morfino-dependencia (MFN)**, mostró una discretísima respuesta al tratamiento, con escaso descenso de los niveles de COR, y consecuentemente un TL_{50} muy similar al grupo no tratado.

El **modelo de inmovilización (INM)**, se comporta como una situación de típico estrés psiconeurógeno, debido a un cambio brusco en las condiciones ambientales, con la consiguiente incapacidad de adaptación, y reacción neuroendocrina asociada, por lo que es más sensible a la acción de un fármaco con efecto adaptógeno. Sin embargo, el modelo de MFN se muestra una vez más, como un sistema complejo, en el que el estímulo se mantiene constante e implica en su metodología sustancias con efecto directo sobre el SNC y el inmune, siendo menos sensible a este tipo de tratamientos.

.- **B)** El siguiente ensayo de manipulación farmacológica es el empleo de **dietil-dithiocarbamato (DTC)**, un inmunomodulador que según se documenta en estudios anteriores, actúa a nivel del neocórtex (RENOUX y col. 1984). La acción de este fármaco, junto con los ensayos previos, que demostraban la importancia de la lateralización hemisférica en el control neurológico de la respuesta inmune (NEVEU 1988, y RENOUX y col. 1980), resaltan la importancia del neocórtex (punto de partida de la reacción de estrés neuropsíquico) en la respuesta inmune. Para este ensayo, se emplea un protocolo similar al del del fármaco anterior, con una dosis que se ajustó en 25 mg/Kg de peso.

Los resultados obtenidos muestran un efecto estimulante intrínseco del fármaco sobre los **linfocitos T** (Fig. 53). Este efecto no parece estar mediado por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, puesto que se corresponde con niveles elevados de COR circulante a

pesar del tratamiento (Fig. 54). Así, el modelo de INM, que mostraba una buena correspondencia entre el nivel de estrés alcanzado y la inmunodepresión (especialmente de linfocitos T), presenta una corrección parcial de este efecto al emplear el DTC.

Los ensayos "*in vivo*" muestran igualmente una modificación del TL_{50} , que disminuye al originarse una mayor actividad inmunológica, que se corresponde con unos niveles de COR elevados. Parece que el efecto del DTC, a través de neocórtex, es de mayor intensidad que el mediado por COR, pues consigue corregir las alteraciones inmunitarias en presencia de niveles elevados de corticosterona.

El modelo de **morfino-dependencia**, que mostraba una complejidad mayor en los estudios de apartados anteriores, parece más sensible al efecto del DTC en nuestros ensayos "*ex vivo*" (Fig. 53); sin embargo, en la reacción PSA, no se producen modificaciones en cuanto a la duración del cuadro. Estas variaciones se desarrollan en presencia de niveles de COR elevados, lo que refuerza la hipótesis anteriormente explicada, así como la idea de que existe una mayor complejidad en la regulación de este modelo de estrés. Las diferencias debidas a las proporciones de Ag/Ac son de carácter cuantitativo, y poco significativas, como cabe esperar por los motivos expresados previamente para el primer grupo de fármacos.

.- **C)** El siguiente grupo de fármacos está integrado por reguladores del sistema serotoninérgico, histaminérgico, y por el cromoglicato, que se ha incluido en este apartado por su implicación en las reacciones inmunológicas mediadas por hipersensibilidad.

Considerando en primer lugar los fármacos antihistamínicos, vemos que la **CIMETIDINA** es un agente anti- H_2 de primera generación, cuyo uso principal es la regulación de la secreción gástrica, no existiendo referencias claras sobre un efecto regulador primario del sistema inmune. Sin embargo los efectos centrales reportados, debidos a la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica, tanto a nivel neurológico (somnolencia), como endocrino (aumento en la producción de prolactina), hacían esperar

algún efecto sobre la regulación neuroinmune. Así, encontramos en el modelo de INM un aumento de la mitogénesis inducida, que llegaba a superar los valores previos a la acción inmunosupresora del estrés (ConA 111%, LPS 100% respecto al control sin estrés). Esto concuerda con el aumento de inmunidad celular, especialmente en pacientes inmunodeprimidos en los que se usó este fármaco (PLAUT y cols. 1982).

Este efecto no parece debido a la mediación adrenal, pues los niveles de COR no sufrieron variación. En el ensayo de anafilaxia (PSA), no se observó potenciación o mejor funcionamiento del sistema inmune, comprobándose un TL_{50} más prolongado. Otros autores han descrito efectos de la histamina sobre células inmunitarias mediadas por receptores H_2 y con una disminución de la producción de mediadores celulares e inmunoglobulinas, así como una menor actividad de neutrófilos (GANELLIN y col 1982). Estos resultados podrían explicarse también por la persistencia del estímulo del estrés. En el modelo de MFN se obtuvieron resultados con una cierta dispersión que no permiten una interpretación fiable.

La **TRIPLELENAMINA**, dentro del grupo de las etildiaminas, fue seleccionada por su especificidad y ausencia de efectos centrales, aunque algunos ensayos reportan somnolencia como efecto secundario. Nuestros resultados muestran una estimulación de la mitogénesis ConA- y LPS-inducidas que, en el caso de la inmovilización, alcanza los valores previos a la situación de estrés, y en la morfínodependencia queda algo por debajo de los valores control, aunque se comprueba la tendencia hacia una inmunorrestauración (Figs. 56 y 57). Los niveles de COR permanecieron por encima de los valores normales, como era de esperar en un fármaco sin efectos neuroendocrinos. Las pruebas de anafilaxia demostraron una corrección de la actividad inmunológica (con valores de TL_{50} más cortos) en ambos modelos de estrés y coincidiendo estos resultados con los obtenidos en los ensayos "ex vivo".

La **CLORFENIRAMINA** se seleccionó por su potente acción y por la abundancia de

efectos centrales, reportados en los ensayos clínicos como efectos secundarios. Sin embargo, en contra de lo esperado, no hubo efecto detectable sobre el estrés, manteniéndose sin cambios los niveles de COR. Hubo un leve incremento en la mitogénesis intrínseca, pero sin que se observaran variaciones en los ensayos mitógeno-inducidos. En los estudios de anafilaxia se detectó un aumento de la mortalidad, incluso previo al desencadenamiento de la reacción de PSA (tres animales de doce); esto hace que el acortamiento del TL₅₀ en los restantes grupos experimentales sea poco valorable. Estos problemas nos hicieron desistir de ensayarlo en el modelo de morfinodependencia.

La **CIPROHEPTADINA** se seleccionó por su efecto antiserotoninérgico, asociado a un efecto anti-histamínico, y a una cierta acción dopaminérgica. Se ha descrito un aumento de la secreción de hormona del crecimiento (GH) para explicar alguno de sus efectos indeseables (HO y col. 1982)

Nuestros resultados obligan a pensar en un doble efecto, ya que por un lado parece disminuir el nivel de estrés, con niveles de COR más bajos que los grupos no tratados; y por otro, presenta un efecto inmunodepresor a nivel celular. El primero puede explicarse por la inhibición del efecto serotoninérgico sobre la hipófisis, ya que algunos autores refieren un aumento en la producción de ACTH debido a serotonina, (KRIGE y col 1978).

Los animales tratados con ciproheptadina presentaron una clara disminución de la blastogénesis intrínseca, y de la mitogénesis en células sensibles. La mitogénesis ConA-inducida, que es la más afectada por el estrés en ensayos previos, continúa deprimida a pesar de la disminución de COR, en consonancia con los otros grupos celulares. Esta depresión no dependiente de los niveles de COR se corresponde con una prolongación del TL₅₀ en los ensayos de PSA.

.- D) El último grupo de fármacos, cuyos resultados se resumen en las Figs. 60 a, b, y c; y en la Tabla IX, incluye inhibidores del Complemento (Suramina), inhibidores de la

acción plaquetaria (Ticlopidina) y antiinflamatorios (Indometacina y Acido flufenámico). Este heterogéneo grupo reúne fármacos cuya única característica común es el hecho de actuar sobre el brazo eferente del sistema inmune, y se seleccionaron buscando efectos en el último eslabón de la interacción neuro-inmune, así como variaciones en su mecanismo de acción al encontrarse el sujeto bajo una situación de estrés.

El tratamiento con **SURAMINA** nos permitió confirmar la hipótesis de que la diferente manifestación clínica de los dos modelos de PSA era debida al sistema de Complemento, ya que con exceso de Ag (Ag 3/Ac 2) se producen inmuno-complejos de pequeño tamaño, aclaramiento rápido y con activación del Complemento (a diferencia de lo que ocurría en la proporción Ag 0,25/Ac 1). En el modelo de PSA correspondiente, se produce un cuadro con un TL_{50} más prolongado que en el otro grupo. Al aplicar el tratamiento con suramina en ambos modelos de PSA, se produce un acortamiento del TL_{50} en el grupo de exceso de Ag, que casi iguala al del modelo con exceso de Ac (que no se ve prácticamente afectado por el tratamiento). De esta forma se comprueba que cuando se bloquea el Complemento, la presentación clínica en ambos modelos se asemeja bastante. Estos resultados confirman la hipótesis inicial, y refuerzan la existencia de dos modelos de PSA con diferente patogenia.

Este efecto se observó también en el grupo de ratones inmovilizados, sin que se produjeran cambios en la concentración sérica de COR. Esta homogeneidad de resultados hizo que no se ensayara en el grupo de morfinodependencia.

En los tratamientos con **TICLOPIDINA**, no presentó resultados de interés, ya que en todos los grupos ensayados se constató una disminución del recuento plaquetario, sin cambios ni en los niveles de COR, ni en los parámetros de PSA. Del mismo modo no pudo demostrarse diferencia en su acción debida al estrés.

En el tratamiento con los dos agentes anti-inflamatorios, obtuvimos diferentes resultados para ambos. Así, el **ACIDO FLUFENAMICO** produjo una disminución en los

niveles de COR, especialmente en los grupos de mayor estrés (Fig 60 a, b, y c). Sin embargo, en la literatura revisada no se han encontrado antecedentes que justifiquen este efecto, aunque algunas publicaciones refieren cambios en la secreción de hormonas hipotalámicas tras la ingesta de antiinflamatorios.

Por otra parte, se comprobó el efecto inhibitor del fármaco sobre el sistema de Complemento, al presentar una acción similar a la de la suramina. Provocando una disminución del TL_{50} en uno de los grupos experimentales de anafilaxia en que se ensayó (Ag 3/Ac2); tanto en el grupo con estrés por de inmovilización, como en el grupo sin estrés. Esta acción cualitativamente similar a la de la suramina, aunque menos intensa, había sido descrita previamente en nuestro Departamento (PORTOLES, 1989).

En el grupo de morfino dependencia se comprobaron niveles de COR disminuidos respecto al grupo no tratado; pero aún así, éstos siguen siendo muy superiores a los del grupo control.

La **INDOMETACINA**, por su parte, produjo una elevación de COR en todos los grupos excepto en el de morfino dependencia que presenta resultados paradójicos. No hemos podido encontrar información sobre este efecto en la literatura revisada. Sin embargo cabe suponer, por la farmacocinética de esta sustancia, que este efecto sea más periférico que central, puesto que por su alta afinidad con las proteínas séricas, traspasa con dificultad la barrera hematoencefálica (GOODMAN, 1986). Se han descrito elevaciones de la concentración sérica de COR, con otros fármacos antiinflamatorios del tipo salicilato (GOODMAN, 1986 b), pero no con esta molécula.

En cuanto a la presentación del cuadro clínico en la reacción de PSA, no se observan diferencias entre los grupos con exceso de Ag o Ac, ya que este fármaco no parece tener efecto selectivo sobre el Complemento. En el modelo de inmovilización se observa una prolongación del TL_{50} con disminución del índice de mortalidad, consecuencia de su efecto antiinflamatorio directo, reforzado por el aumento de inmunosupresión

secundaria a una situación de estrés (elevación de los niveles de COR). El modelo de MFN tuvo de nuevo un comportamiento paradójico tras la utilización del fármaco, lo que revela una regulación más compleja del mismo.

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1.- El modelo de inmovilización establecido, resulta incruento y normalizable, es capaz de producir un cuadro de estrés experimental repetible y cuantificable comportamental y bioquímicamente. En esta situación se origina una inmunodepresión de carácter generalizado que afecta básicamente, a la regulación de la respuesta inmune a nivel celular.

2.- También puede originarse una situación de estrés mediante la instauración de morfino-dependencia, que se agudiza al inducir un síndrome de abstinencia; y que, en cualquier caso, produce una inmunodepresión más intensa que la originada por inmovilización, y se relaciona con la dosis y pauta de administración de dicha droga.

3.- La inmunodepresión subsiguiente a las situaciones de estrés aquí descritas, son de intensidad variable y afectan, fundamentalmente, a los linfocitos T cooperadores CD4⁺ y a la actividad estimuladora de la IL-2. También resulta afectada la citotoxicidad no mediada por anticuerpos; mientras que el efecto sobre los linfocitos B es consecuencia de las alteraciones en la cooperación celular T-B.

4.- Las respuestas de anafilaxia pasiva sistémica aquí estudiadas, presentan una diferente fisiopatología en función de la relación Ag/Ac, que hace posible la participación o no del Complemento. Sin embargo, las reacciones cutáneas solo permiten detectar algunas variaciones cuantitativas.

5.- La inmunodepresión originada en situaciones de estrés, condiciona una disminución en la agresividad de los cuadros anafilácticos, reflejo de una menor reactividad de los linfocitos T y de una disminución del número y función de eosinófilos.

6.- La interacción neuro-inmune en situaciones de estrés, cursa con una inmunodepresión de similares características sea cual fuere el origen del agente estresante. Sin embargo se observan algunas diferencias: así, en el caso de morfinodependencia, parece existir una regulación multifactorial mas compleja que implica tanto al eje neuro-endocrino, como a interacciones receptor ligando en células inmunocompetentes.

7.- La modulación de estas interacciones puede conseguirse: a) mediante tratamientos con eleuterósidos, que parecen intervenir directamente en los mecanismos neuroendocrinos de estrés, a nivel de mensajeros secundarios; b) actuando con inmunomoduladores sobre el neo-córtex, consiguiendo una restauración de la respuesta inmune por mecanismos que parece no implicar el eje hipofiso-adrenal.

8.- En cuanto al resto de los fármacos ensayados: a) los tratamientos con anti-histamínicos y antiserotonérgicos, según nuestro protocolo, no parecen intervenir en la comunicación neuroinmune, aunque se observan efectos sobre el mecanismo inmunitario; b) los tratmientos con antiinflamatorios, pese a su capacidad de intervenir en la activación del Complemento y en el brazo efector de la respuesta inmune, no parecen interferir con el mecanismo de inmunodepresión secundario al estrés.

VII. BIBLIOGRAFIA.

AKIL, H., WATSON, S.J., YOUNG, E., LEWIS, M.E., KHACHATURIAN, H. y WALKER, J.M.- Endogenous opioids: biology and function. *Aun. Rev. Neurosci.* 7, 223 (1984).

ALLEN J.P., ALLEN, C. F., GREER, M.A. Y JACOBS, J.J. -Stress-induced secretion of ACTH. En: "Brain-pituitary-adrenal interrelationships" A.BRODISH (Ed.) Karger, Basel. 99-127 (1973).

AMIR, S., BROWN, Z.W. y AMIL, Z.-The role of endorphins in stress: evidence and speculations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 4, 77-81 (1980).

AMIR, S. Anti-anaphylactic acción in the mouse of thyrotropin-releasing hormone is mediated through beta-1-adrenoceptive effectors. *Neurosci. Lett.* 46, 127-130 (1984).

AMIR, S. Beneficial effects of i.c.v. naloxone in anaphylactic shock is mediated through peripheral beta-adrenoceptive mechanisms. *Brain. Res.* 290, 191-194 (1984 a).

AMIR, S., Y REE, J. M. Beneficial effect of τ -endorphin-typr peptides in anaphylactic shock. *Brain Res.* 329, 329-333 (1985).

ANDERSON, W.H., O'DONELL, M., SIMKO, B.A. y WELTON, A.F. An in vivo model for measuring antigen-induced SRS-A-mediated bronchoconstriction and plasma SRS-A levels in the guinea pig. *Brit. J. Pharmacol.* 78, 67-74 (1983).

ANISMAN, H., REMINGTON, G. y SKLAR, L.S. Effects of inescapable shock on subsequent escape performance: catecholaminergic and adrenergic mediation response initiation and maintenance. *Psychopharmacology* 61, 107-124 (1979).

ARRANG, J.M., GARBANG, M. y SCHWARTZ, J.C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature* 302, 832-837 (1983).

ARRANG, J.M., GARBANG, M. y SCHWARTZ, J.C. Autoregulation of histamine release in brain by presynaptic H3-receptors. *Neuroscience* 15, 553-562 (1985).

ARRANG, J.M., GARBANG, M. y SCHWARTZ, J.C. Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H3-receptors. *Neuroscience* 23, 149-157 (1987).

ASKENAZE, P.W. Role of basophils, masts cells and vasoamines in hypersensitivity reactions with delayed time course. *Prog. Allergy* 23,199-204. (1977)

ASKENAZE, P.W. Effectors cells in late and delayed hypersensitivity reactions that are dependent on antibodies or T cells. En: "Immunology 80" Eds. FOUGEREAD & DAUSSET. Academic Press. N.Y. p. 829 (1980).

ATEWH, S.F. y KUHAR, M.J. Distribución and physiologic significance of opioid receptor in the brain. *Br. Med. Bull.* 39, 47-52 (1983).

AXELROD, J., Y REISINE, T.D. Stress hormones: Their interaction and regulation. *Science* 224, 452-459 (1984).

- BALLIEUX, R. E. y HEIJNEN, C.J. Brain and immune system: a one-way conversation or a genuine dialogue ?. *Progress in Brain Res.* 72, 71-77 (1987).
- BAKER, P.J. y WILSON, J.B. Chemical composition and biological properties of the endotoxin of *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.* 90,895-902. (1965)
- BARCHAS, J.D., AKIL, H., ELLIOTT, G.R., HOLMAN, R.B. y WATSON, S. Behavioural neurochemistry: neuro-regulators and behavioural states. *Science* 200, 964-973 (1978).
- BARDWELL, J.C.A. y CRAIG, E.A. Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible genes are homologous. *Proc. Natl. Acad. USA* 81, 848-852 (1984).
- BARNES, C.A., McNAUGHTON, B.L., GODDARD, G.V., DOUGLAS, R.M. y ADAMEC, R. Circadian rhythm of synaptic excitability in rat and monkey central nervous system. *Science* 197, 91-92 (1977).
- BARTOSCH, R., FELBERG, W. y NAGEL, E. Weitere versuche über das freierwerden eines histaminähnlichen stoffes aus der durchströmten lunge sensibilization meerschweinchen beinauslösen einer anaphylaktischen lungenstarre. *Pflügers fur Ges. Physiol.Arch.* 231, 616-629 (1932).
- BARTROP, R.W., LUCKHURST, E., LAZARUS, L., KILOH, L.B. y PENNY, R. Depressed lymphocyte function after bereavement. *Lancet* 1, 834-836 (1977).
- BASSET, S.R. y CAIRNCROSS, K.D. Myocardial sensitivity to catecholamines following exposure of rats to irregular signalled footshock. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4, 27-37 (1976).
- BAYER, B.M. y FLORES, Ch.M. Effects of morphine on lymphocyte function: possible mechanism of interaction. En: "Drugs of abuse and immune function" Ed. R.R. Watson, CRC Press. Boston. pags. 151-173 (1991).
- BENNER, R. y VAN OUDENAREN, A. Corticosteroids and the humoral response of mice: II. Enhancement of bone marrow antibody formation to lipopolysaccharide by high doses of corticosteroids. *Cell. Immunol.* 48, 267-275. (1979).
- BERCZI, I. y NACY, E. The effect of prolactin and growth hormone on hemolymphopoietic tissue and immune function. En: "Hormones and Immunity" Eds. I: Berczi & K. Kovacs. MTP Press Ltd. Lancaster 145-171 (1986).
- BERKENBOSCH, F., VAN OERS, J., DEL REY, A., TILDER, F. y BESEDOVSKY, H. Corticotropin-releasing factor-producing neuron in the rats activated by interleukin-1. *Science* 238, 524-526 (1987).
- BESEDOVSKY, H.O., FELIX, D. y HAAS, H. Hypothalamic changes during the immune response *Eur. J. Immunol.* 7, 323-325 (1977).
- BESEDOVSKY, H.O., DEL REY, A., SORKIN, E., DA PRADA, M. y KELLER, H.H. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell. Immunol.* 48, 346-355 (1979).

- BESEDOWSKY, H.O. y SORKIN, E. Network of immune-neuro-endocrine interactions. Clin. Exp. Immunol. 27, 1-12 (1977a).
- BESEDOVSKY, H.O., DEL REY, A. y SORKIN, E. Immunoregulation. Eds. Fabris, W., Garaci, E., Hadden, J. y Mitchinson, N.A. Plenum Press, London 315-339 (1983).
- BEUSCHER, H.V. y BRADE, V. Lipopolysaccharides as complement inhibitors by complex formation with the purified 3rd complement component (C3) Immunobiol. 173, 41-55 (1986).
- BIANCO, A.E., FAVALORO, J.M., BURKOF, T.R., CULVENOR, J.G., CREWETHER, P.E., et al. A repetitive antigen of Plasmodium falciparum that is homologous to heat shock protein 70 of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38, 8713-8717 (1986).
- BLALOCK, J.E. y BARON, S. Interferon-induced transfer of viral resistance between animal cells. Nature 269, 422-425 (1977).
- BLALOCK, J.E. y STANTON, J.D. Common pathways of interferon and hormonal action. Nature 283, 406-408 (1980).
- BLALOCK, J.E. y SMITH, E.M. Human leukocyte interferon: Structural and biological relatedness to adrenocorticotrophic hormone and endorphins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5972-4 (1980).
- BLALOCK, J.E. y SMITH, E.M. Human leukocyte interferon: potent endorphin-like opioid activity. Biochem. Biophys. Res. Comm. 101, 472-478 (1981).
- BLALOCK, J.E. The immune system as a sensory organ. J. Immunol. 132, 1067-70 (1984).
- BLALOCK, J.E. Relationship between neuroendocrine hormones and lymphokines. Lymphokines. 9, 1-18 (1984).
- BLALOCK, J.E., HARBOUR-Mc MENAMIN, D., y SMITH, E.M. Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems. J. Immunol. 135, 858-861 (1985).
- BLALOCK, J.E., y SMITH, E.M. A complete regulatory loop between the immune and neuro-endocrine systems. Fed. Proceed. 44, 108-111. (1985a).
- BLASIG, J., HERZ, A., REINHOLD, K. y ZIELGANSBERGER, S. Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome in rats. Psychopharmacology 33, 19 (1973).
- BLECHA, F., BARRY, R. A. y KELLEY, K.W. Stress-induced alterations in delayed-type hypersensitivity to SRBC and contact sensitivity to DNFB in mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 169, 239-246 (1982).
- BLECHA, F., KELLEY, K.W. y SATTERLEE, D. Adrenal involvement in the expression of delayed-type hypersensitivity to SRBC and contact sensitivity to DNFB in stressed mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 169, 247-252 (1982 a).
- BLOOM, F., SEGAL, D., LING, N., y GUILLEMIN, R. Endorphins: Profound behavioural effects in rats suggest new etiological factors in mental illness. Science 194, 630 (1976).

BLOOM, F.E. The functional significance of neurotransmitters diversity. *Am. J. Physiol.* 246, c184-c194 (1984).

BOHUS, B., BENUS, R.F., FOKKEMA, D.S., KOOLHAAS, J.M., NYAKAS, C., VanOORTMERSSEN, PRINS, A.J., De RUITER, A.J.H., SCHEURINK, A.J.W. y STEFFENS, A.B. Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses. *Progress in Brain Res.* 72, 57-70 (1987).

BORANIC, M., PERICIC, D., RADACIC, M., POLJAK-BLAZI, V. y MILJENOVIC, G. Immunological and neuroendocrine response of rats to prolonged or repeated stress. *Biomed. Pharmacother.* 36, 23-28 (1982).

BORANIC, M., PERICIC, D., POLJAK-BLAZI, M. y SVERKO. Suppression of the immune response by drugs interfering with the metabolism of serotonin. *Experientia* 40, 1153-1155 (1984).

BRAQUET, P., GUINOT, Ph. y TOUVAY, C. The role of PAF-acether in anaphylaxis demonstrated with the use of the antagonist BN 52021. En: "PAF, platelets, and asthma". Ed: Schmitz-Schumann, Menz & Page. -Birkhäuser Verlag. Basel. pag 97-117 (1987).

BREKHMANN, I.I. y DARDYMOV, I.V. Pharmacological investigation of glycosides from Ginseng and Eleutherococcus. *Lloydia* 32, 46-51 (1969).

BROCKLEHURST, W.E. Slow reacting substance and related compounds. *Progr. Allergy* 6, 539-558 (1958).

BROCKLEHURST, W.E. The release of histamine and formation of a slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock. *J. Physiol. London* 151, 416-435 (1960).

BROOKS, W.H., NETSKY, M.G., NORMANSELL, D.E. y HORWITZ, D.A. Depressed cell-mediated immunity in patients with primary intracranial tumors. Characterization of a human immunosuppressive factor. *J. Exp. Med.* 136, 1631-1647 (1972).

BROWN, S.L. y Van EPPS, D.E. Suppression of T lymphocyte chemotactic factor production by the opioid peptides, beta-endorphin and met-enkephalin. *J. Immunol.* 134, 3384-3390 (1985).

BRYANT, H.U., CONROY, W.G., ISOM, G.E., MALVEN, P.V. y YIM, G.K.W. Presence of dynorphin-like immune activity but not opiate binding in Walker-256 tumors. *Life Sci.* 37, 155-160 (1985).

BRYANT, H.U., BERNTON, E.W. y HOLADAY, J.W. Morphine pellet-induced immunomodulation in mice: temporal relationships. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245, 913 (1988).

BRYANT, H.U., BERNTON, E.W. Y HOLADAY, J.W. Morphine-induced immunosuppression: involvement of glucocorticoids and prolactin, in *Problems of Drug Dependence. Proc. 50th. Ann. Scientific Meet., Committee of Problems of Drug Dependence, "National Institute Drug Abuse Research Monogr. Ser." n°77 Washington D.C. (1988a).*

- BRYANT, H.U., BERNTON, E.W., KENNER, J.R., SHAKARJIAN, T.K. and HOLADAY, J.W. Suppression of macrophage function and increase lethality in bacterial infection in mice given morphine pellet implants. *FASAB J*, 2,A 1260 (1988b).
- BRYANT, H.U., YOBURN, B.B., INTURRISI, C.E., BERNTON, E.W. y HOLADAY, J.W. Morphine-induced immunomodulation is not related to serum morphine concentrations. *Eur. J. Pharmacol.* 149, 165 (1988c).
- BYARS, N.E. Two adjuvant-active muramyl-dipeptide analogs induce differential production of lymphocyte activating factor and a factor causing distress in guinea pigs. *Infect. Immun.* 44, 344-350 (1984).
- CANNON, W.B. Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage Ed. Appleton N.York. (1915).
- CASALE, J.B., BOWMAN, S. y KALINER, M. Induction of human cutaneous mast-cell degranulation by opiates and endogenous opioid peptides: Evidence for opiate and non-opiate receptor participation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73, 775-781 (1984).
- CHAHL, L.A. y CHAHL, J.S. Plasma extravasation induced by dynorphin (1-13) in rat skin. *Eur. J. Pharmacol.* 124, 343-347 (1986).
- CHEIFETZ, P., GAUFFUD, N. y DINGMAN, J.F. Effects of bilateral adrenalectomy and continuous light on the circadian rhythm of corticotropin in female rats. *Endocrinology* 82, 1117-1124 (1968).
- CHIORAZZI, N., ESHHAR, Z., KATZ, D.H. Induction of immunological tolerance to the major antigenic determinant of penicillin: a therapeutic approach to penicillin allergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73,2091-2095 (1976).
- CHRISTMAN, M.F., MORGAN, R.W., JACOBSON, F.S. y AMES, B.N. Positive control of aregulation for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella Typhimurium*. *Cell* 41,753-762 (1985).
- CLAAS, F.H.J., Van REE, J.M., VERHOEVEN, W.M.A, Van der POEL, J.J., VERDUYN, W., de WIED, D. y Van ROOD, J.J. The interaction between λ -type endorphins and HLA class I antigens. *Human Immunol.* 15, 347 (1986).
- COCEANI, F., LEES, J. y DINNARELLO, C.A. Occurrence of interleukin-1 in cerebrospinal fluid of the conscious cat. *Brain Res.* 446, 245-250 (1988).
- COCHRANE, CH.G. y KOEFFLER, D. *Immune complex disease in experimental animals and man.* *Adv. Immunol.* 16, 185-264 (1973).
- COCHRANE, C.G. *The role of complement in experimental disease models.* *Springer Semin. Immunopathol.* 7, 263-279 (1984).
- COHEN, J.J. y CRNIC, L.S. Glucocorticoids, stress, and the immune response. En: "Immunopharmacology and the regulation of leukocyte function". Ed. D.R. Webb, M. Dekker, N.York. 61-69 (1982).

- COLLINS, P.L. y HYGHOWER, L.E. Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat shock) mRNAs and proteins. *J. Virol.* 44, 703-707 (1982).
- CRAIG, E.A. The heat shock response. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 18, 239-280 (1985).
- CROISET, G., HEIJNEN, C.J., VELDHUIS, H.D., de WIED, D. y BALLIEUX, R.E. Modulation of the immune response by emotional stress. *Life Sciences* 40, 775-782 (1987).
- CROSS, R.J., MARKESBY, W.R., BROOKDS, W.H. y ROSZMANN, T.L. Hypothalamic-immune interactions I. The acute effect of anterior hypothalamic lesions on the immune response. *Brain Res.* 196, 79-87 (1980).
- CURMAN, B., ÖSTBERG, L., SANDBERG, L., MALMHEDEN-ERIKSON, I., STÄLEMHEIM, L., RASK, L. y PETERSON, P. H-2 linked Ss protein is C4 component of complement. *Nature* 258, 243-244 (1975).
- CZLONKOWSKA, A., CYRTA, B. y KORLAK, J. *J. Neurol. Sci.* 43, 455-462 (1979); Ref. en: NEVEU, P.J. Cerebral neocortex modulation of immune system. *Life Sci.* 42, 1917-1923 (1988).
- DAFNAY, N., PRIETO-GOMEZ, B. y REYES-VAZQUEZ, C. Does the immune system communicate with the central nervous system? Interferon modifies central nervous activity. *J. Neuroimmunol.* 7, 1-12 (1985).
- DAMASIS, C., RIVEAU, G., PARANT, M., GEROTA, J. y CHEIDD, L. Production of lymphocyte activating factor in the absence of endogenous pyrogen by rabbit or human leucocytes stimulated by a muramyl-dipeptide derivative. *Int. J. Immunopharmacol.* 4, 451-462 (1982).
- DANA, R. y MARTIZEZ, J.L. Effect of adrenalectomy on the circadian rhythm of LTP. *Brain Res.* 308, 392-395 (1984).
- DANIELS, C.J., MCKEE, A.H.Z. y DOOLITTLE W.F. Archaeobacterial heat shock proteins. *EMBO J.* 3, 745-749 (1984).
- DANTZER, R. y KELLEY, K.W. Stress and immunity: An integrate view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sci.* 44, 1995-2008 (1989).
- DEMANT, P., CAPKOVA, J., HINZOVA, E. y VORACOVA, B. The role of the histocompatibility-2-linked Ss-Slp region in the control of mouse complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 863-864 (1973).
- De JONGH, B.M., VERHOEVEN, W.M.A., VaN REE, J.M. De WIED, D. y Van ROOD, J.J. HLA and the response to treatment with gamma-type endorphins in schizophrenia. *J. Immunogenetics* 9, 381 (1982).
- De WIED, D. Effects of peptide hormones on behavior. En: "Frontiers in neuroendocrinology" Eds. W.F. Gamong & L. Martin, Oxford. Univ. Press N.Y. 97-140 (1969).
- DEVOINO, L., ELISEEVA, L., EREMINA, O., IDOVA, G. y CHEIDO, M. 5-Hydroxytryptophan effect on the development of the immune response: IgM and IgG antibodies and rosette formation in primary and secondary responses. *Eur. j. Immunol.* 5, 394-399 (1975).

DIAZ, R. y BOSSERAY, N. Influence de l'infection par *Brucella abortus* sur l'hypersensibilité et l'hyperreactivité de la souris aux endotoxines de *B. melitensis*, *Yersinia enterocolitica* et *Escherichia coli*. *Ann. Rech. Vétér.* 1, 41-56 (1974).

DICKINSON, S., KENNETH, G. y CURZON, G. Reduced 5-hydroxytryptamine-dependent behaviour in rats following chronic corticosterone treatment. *Brain Res.* 345, 10-18 (1985).

DIMOND, S.J. y BLIZARD, D.A. N.Y. Acad. Sci. (1987). Ref. en: NEVEU, P.J. Cerebral neocortex modulation of immune functions. *Life Sci.* 1917-1923 (1988).

DINARELLO, C.A. y ROSENWASSER, L.J. Lymphocyte activating property of human leucocytic pyrogen. *Adv. Immunopharm.* 327-340 (1981).

DISTELHORT, C.W. y BENUTTO, B.M. Glucocorticoid receptor content of T lymphocytes: Evidence for heterogeneity. *J. Immunol.* 126, 1630-1634 (1981).

DIXON, E.J. FIELDMAN, J.D. y VASQUES, J.J. Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 113, 899-919 (1961).

DOUGLAS, W.W. Histamine and antihistamine; 5-hydroxytryptamine and their antagonist. En: "Pharmacologic Basis of Therapeutics". Ed. L.S. Goodman & A. Gilman. MacMillan Pub. Co. Inc. N.Y. 590-629 (1975).

DUNN, A.J., POWELL, M.L., MORESHEAD, W.V., GASKIN, J.M. y HALL, N.R. *Brain Behav. Immun.* 1, 216-230 (1987) Ref. en: DANTZER, R. y KELLEY, K.W. Stress and Immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sci.* 44, 1995-2008 (1989).

EDWARDS, A.J., BACON, T.H., ELMS, C.A., VERARDI, R., FELDER, M. y KNIGHT, S. Changes in the population of lymphoid cells in human peripheral blood following physical exercise. *Clin. Exp. Immunol.* 58, 420-427 (1984).

ELLIS, J. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328, 378-379 (1987)

EPSTEIN, L.B., ROSE, M.E., McMANUS, N.H. y LI, Ch.H. Absence of functional and structural homology of natural and recombinant human leukocyte interferon with human alpha-ACTH and beta-endorphin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 104, 341-346 (1982).

ESKOLA, J., RUUSKANEN, O., SOPPI, E., VILJANEN, M.K., JÄRVINEN, M., TOIVONEN, H. y KOUVALAINEN, K. Effect of sport stress on lymphocyte transformation and antibody formation. *Clin. Exp. Immunol.* 32, 339-342 (1978).

FADEN, A.I. y HOLADAY, J.W. Experimental endotoxin shock: The pathophysiologic function of endorphins and treatment with opiate antagonist. *J. Infectious Dis.* 142, 229-238 (1980).

FELDMAN, S., CONFORTI, N. y SIEGEL, R.A. Adrenocortical responses following limbic stimulation in rats with hypothalamic deafferentations. *Neuroendocrinology* 35, 205-211 (1982).

- FENK, K. y ZBINDEN, G. Toxicity of interferon and interlekin Trends Pharmacol. Sci. 8, 100-105 (1987)
- FERREIRA, A. y NUSSENZWEIG, V. Genetic linkagebetween serum levels of the third component of complement and the H-2 complex. J. Exp. Med. 141, 513-517 (1975).
- FILLION, G., BONNET, M., FILLON, M.P., MORELET, L., PRUDHOME, N., MASEK, K., FLGEL, M., CORVALA, N., y LANUAY, J.M. Hypothetical role of the serotonergic system in neuroimmunomodulation: Preliminar molecular studies. En:" Interaction between the neuroendocrine and immune systems" Ed. J. Hadden, K. Masek & G. Nistico. Pytagora Press, Milan (1988).
- FINE, D.P. Activation of the classic and alternative complements pathways by endotoxin. J. Immunol. 112, 763-769. (1974).
- FOON, K.A., WAHL, S.M., OPPENHEIM, J.I. y ROSENSTREICH, D.L. Serotonin-induced production of a monocyte chemotactic factor by human peripheral blood leukocytes. J. Immunol. 117, 1545-1552 (1976).
- FOREMAN, J.C., y JORDAN, C.C. Histamine release and vascular changes induced by neuropeptides. Agents and Actions 13, 105-111 (1983).
- FORTIER, C. Dual control of adrenocorticotrophin release. Endocrinology 49, 782-788 (1951).
- FRAIOLI, F., MORETTI, C., PAOLUCCI, D., ALICICCO, E., CRESCENZI, F. y FORTONIO, G. Physical exercise stimulates marked concomitant realase beta-endorphin and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in peripheral blood in man Experientia. 36, 987 (1980).
- GAINOTTI, G. Cortex 8, 41-55 (1972).
- GALIN, D. Arc. Gen. Psychiat. 3, 572-583 (1974); Ref. en: NEVEU, P.J: Cerebral neocortex modulation of immune system. Life Sci. 1917-1923 (1988).
- GALLOWAY, D.A. y Mc DOUGALL, J.K. The oncogenic potential of herpes simplex viruses: evidence for a "hit-and-run" mechanism. Nature 302, 21-24 (1983).
- GARBARG, M., BARBIN, G., BISCHOFF, S., POLLARD, H. y SCHWARTZ, J.C. Histaminergic pathway in rat brain evidenced by lessions of the medial forebrain bundle. Science 186, 833-834 (1974).
- GESCHWIND, N. y BEHAN, P. Left-handedness: Association with immune disease, migraine, and developmental learning disorders. Proc. Natl. Acad. Sci. USA . 79, 5097-5100 (1982).
- GIBSON, R.D., TINGSTAD, J.E. Formulation of a morphine implantation pellet suitable for tolerance- physical dependence studies in mice. J. Pharmacol. Sci. 59, 426-427 (1970).
- GILMAN, S.C., SCHWARTZ, J.M., MILNER, R.J., BLOOM, F.E. y FELDMAN, J.D. Beta-endorphin enhances lynphocyte proliferative responses. Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 4226-4230 (1982).

- GILLIS, S., FEIM, M.H., OU, W. y SMITH, K.A. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.* 120, 2027-2033 (1978).
- GIRON, L.T., CURTCHEN, K.A. y DAVIS, J.N. Lymph nodes: a possible site for sympathetic neuronal regulation of immune responses. *Ann. Neurol.* (), 520-527 (1980).
- GISPEN, W.H., WIEGANT, V.M., BRADBURY, A.F., HULME, E.C., SMYTH, D.G., SNELL, C.R. y De WIED, D. Induction of excessive growing in the rats by fragments of lipotropin. *Nature (London)* 264, 794-795 (1976).
- GLAZER, H.I. y WEISS, J.M. Long-term interference effect: an alternative to "learned helpness". *J. Exp. Physiol. Anim. Behav. Process.* 2, 202-213. (1976).
- GLOWINSKI, J., TASSI, N., J.P., BLANC, G. y THIERRY, A.M. The mesocortical dopaminergic systems. En: *Rhinencephale neurotransmetteurs et Phycoses Georg et Masson.* Paris. Pp. 135-147 (1977).
- GLAZER, H.I. y WEISS, J.M. Long-term interference effect: an alternative to "learned helplessness". *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 2, 202-213 (1976).
- GOETZL, E.J., CHERNOV, T., RENOLD, F. y PAYAN, D.G. Neuropeptide regulation of the expression of immediate hypersensitivity. *J. Immunol.* 135, 802-805 (1985).
- GOLDBERG, A.M., y FRAZIER, J.M. Alternatives to animals in toxicity testing. *Sci. Amer.* 261, 16-22 (1989).
- GORCZYNSK, R.M., McRAE, S. y KENNEDY, M. Conditioned immune response associated with allogenic skin grafts in mice. *J. Immunol.* 129, 704-709 (1982).
- GOOSE, J., y BLAIR, A.M. Passive cutaneous anaphylaxis in rats, induced with two homologous reagin-like antibodies and its specific inhibition with disodium cromoglycate. *Immunology* 16, 749-760 (1969).
- GRAY, J.A. *The Neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the Septo-hippocampal System.* Clarendon Press Oxford. (1982).
- GREENBERG, A.H. Behavioural immunology. *Immunol. Today.* Sup. 27-28 (1986).
- GURLL, N. Naloxone in endotoxic shock; experimental models and clinical perspective. *Adv. Shock Res.* 10, 63-71 (1983).
- HADDEN, J.W. Neuroendocrine modulation of the thymus-dependent immune system: Agonist and mechanism. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 496, 39-48 (1988).
- HALL, N.R., LEWIS, J.K. y SCHIMPF, R.D. Effects of diencephalic and brainstem lesions on haemopoietic stem cells. *Soc. Neurosci. Abs.* 4, 20-26 (1978).
- HAMBER, M., SVENSSON, J., HEDQUIST, P., STRAMBERG, K. y SAMUELSSON, B. *Adv. Prost. Tromb. Res.* 1 494-501 (1976). Ref en: BACH, m.k. Mediators of anaphylaxis and inflammation. *Ann. Rev. Microbiol.* 36, 371-413 (1982).

- HAMMAR, J.A. Innervations-verhaltnisse der krelorgane der thymus bis in der 4 tetalmonat. Z. Microskant. Forsch. 8, 253-258 (1935).
- HANBAUER, I., KELLY, G.D., SAIAN, L. y LANG, H.Y.T. Met5-enkephalin like peptides of the adrenal medulla: Release by nerve stimulation and functional implications. Peptides 3, 469-473 (1982).
- HARNAD, S., DOTY, R.W., GOLDSTEIN, L., JAYNES, J. y KRAUTHAMER, J. Acad. Press N.Y. (1977); Ref. en: NEVEU, P.J. Cerebral neocortex modulation of immune functions Life Sci. 42, 1917-1923 (1988).
- HAZUM, E., CHANG, K.J. y CUATRECASAS, P. Specific nonopiate receptors for beta-endorphin. Science 205, 1033-1035 (1979).
- HEBERMAN, R.B. y ORTALDO, J.R. Natural killer cells: their role in defenses against disease. Science 214, 24-30 (1981).
- HEDSTROM, R., CULPEPPER, J., HARRISON, R.A., AGABIAN, N. y NEWPOPRT, G. A major immunogen in Schistosoma mansoni infections in homologous to the heat-shock proteins Hsp 70. J. Exp. Med. 165, 1430-1435 (1987).
- HERKENHAM, M. y Mc LEAN, S. Mismatches between receptor and trasmitter localizations in the brain. En: "Quantitative receptor autorradiography" Eds. C. Boast, E.W. Snowhill & C:A: Altar. Liss. N.Y. 137-171 (1986).
- HERXHEIMER, H. Repetable "microshocks" of constant strength in guinea-pig anaphylaxis. J. Physiol. 117, 251-253 (1952).
- HIGHTOWER, L.E. ultured animal cells expoxed to aminoacid analoges of puromycin rapidly synthesize several polypeptides. J. Cell. Phisiol. 102, 407-427 (1980).
- HIGHTOWER, L.E. y WHITE, F.P. Cellular responses to stress: comparison of a family of 71-73 kilodalton proteins rapidly synthesized in rat tissues slices and canavaline-treated cells in culture. J. Cell. Physiol. 108, 261-275 (1981).
- HIROSHIGE, T. y SAKAKURA, M. Circadian rhythm of corticotropin releasing activity in the hypothalmus of normal and adrenalectomized rats. Neuroendocrinology 7, 25-36 (1971).
- HO, I.K., LU, S.E., STOLMAN, S., LOH, H.H. y WAY, E.L. Influence of p-clorophenylalanine on morphine tolerance and physical dependence and regional brain serotonin turnover studies in morphine tolerant dependent mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 182, 155-165 (1972).
- HO, P.C., LEWIS, R.A., AUSTEN, K.F. Y ORANGE, R.P. Mediators of immediate hypersensitivity En: "Cellular, molecular and clinical aspect of allergic disorders". Eds.: S. Gupta & R.A. Good. Plemm. N:Y: 179-228 (1979).
- HOLADAY, J.W. y FADEN, A.I. Naloxone reversal of endotoxic hypotension suggest role of endorphins in shock. Nature 275, 450-451 (1978).
- HOLADAY, J.W. y LOH, H.H. Endorphin-opiate interaction with neuroendocrine system. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 20, 227-258 (1979).

- HOLADAY, J.W. Cardiovascular effects of endogenous opiate systems. *Am. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 541-594 (1983).
- HOLT, P.G., BATTY, J.E. y TURNER, K.J. Inhibition of specific Ig E responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen *Immunology* 42, 409-413 (1981).
- HONMA, K.I., HONMA, S. y HIROSHIGE, T. Feeding-associated corticosterone peak in rats under various feeding cycles. *J. Physiol.* 246, R72-R726 (1984).
- HOPWOOD, R.T. y TIBOLLA, T.J. The effect of adrenocorticotrophic hormone on the circulating eosinophil levels. A possible screening test for adrenal gland function in the cow. *Amer. J. Vet. Res.* 19, 833-839 (1958).
- IMAI, T., SHIMIZU, F., FUJIMAKI, H. y WATANABE, N. Enhancement of IgE antibody production by ovalbumin aerosol in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 70, 360-394 (1983).
- INGLOT, A.D. The hormonal concept of interferon *Arch. Virol.* 76, 1-13 (1983).
- IRWIN, M., SMITH, T.L. y GILLIN, J.Ch. Low natural killer cytotoxicity in major depression. *Life Sci.* 2127-2133 (1987).
- IVERSEN, S.D. Brain dopamine systems and behaviour. En: "Handbook of psychopharmacology". Eds. Iversen y cols. Plenum Press N.Y. Vol. 8, 333-384 (1977).
- IVERSON, L.L. Aminoacids and peptides: fast and slow chemical signals in the nervous system. *Prpc. R. Soc. London Ser. B.* 221, 245-260 (1984).
- JACQUET, Y.F. y MARKS, N. The C-fragment of β -lipotropin: An endogenous neuroleptic or antipsychotogen ? *Science.* 194, 632-635 (1976).
- JANSSEN, H.F. Studies on a central site of action of naloxone in endotoxin shock. *Ach. Shock. Res.* 10, 73-89 (1983).
- JHANWAR-UNIYAL, M., ROLAND, R. y LEIBOWITZ, S. Diurnal rhythm of alfa2-noradrenergic receptors in the paraventricular nucleus and other brain areas; relation to circulating corticosterona and feeding behaviour. *Life Sci.* 38, 473-482 (1986).
- JOHNSON, H.M., TORRES, B.A., SMITH, E.M., DION, L.D. y BLALOCK, J.E. Regulation of lymphokine (gamma-interferon) production by corticotrophin. *J. Immunol.* 132, 246-250 (1984).
- KABAT, E.A. Structural concepts in Immunology and Immunochemistry. Ed. Holt, Rinehart & Winston. N.Y. (1968).
- KANETA, S., ISHIZUKI, S., FUJIHIRA, E. y MITSUYA, M. Mouse paw anaphylaxis. *J. Immunol. Meth.* 71, 83-95 (1984).
- KATZ, P., ZAYTOUN, A.M. y LEE J.H.Jr. Characterization of corticosteroid receptors in natural killer cells: comparison with circulating lymphoid and myeloid cells. *Cell. Immunol.* 94,347-352 (1985).

KAUFMANN, S.H., VATH, U., THOLE, J.E.R., Van EMDEN, J.D.A. y EMMRICH, F. Enumeration of T cells reactive with mycobacterium tuberculosis organism and specific for the recombinant mycobacterial 64 KD protein. *Eur. J. Immunol.* 17, 351-357 (1987).

KELLER, S.E., STEIN, M., CAMERINO, M.S., SCHLEIFER, S.J. y SHERMAN, J. Suppression of lymphocyte stimulation by anterior hypothalamic lesions in guinea pig. *Cell. Immunol.* 52, 334-340 (1980).

KELLER-WOOD, M.E. y DALLMAN, M.F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrinol. Rev.* 5, 1-24 (1984).

KELLEY, P.M., ALIPERTI, G. y SCHLESINGER, M.J. In vitro synthesis of heat-shock proteins by mRNAs from chicken embryo fibroblast. *J. Biol. Chem.* 255, 3230-3233 (1980).

KELLEY, K.W. Stress and immune function: A bibliographic review. *Ann. Rech. Vet.* 11, 445-478 (1980).

KENNETT, G., DICKINSON, S. y CURZON, G. Central serotonergic responses and behavioral adaptation to repeated immobilization: the effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. *Eur. J. Pharmacol.* 119, 143-152. (1985).

KIND, L.S. y MACEDO-SOBRINHO, B. Heterologous adoptive cutaneous anaphylaxis: A method for detecting reaginic antibody formation by cells of the mouse *J. Immunol.* 111, 638-644 (1973).

KIND, L.S. y ALLAWAY, E. Homologous adaptive cutaneous anaphylaxis (HoACA). a method which detects Ig G antibody in the mouse at the cellular level. *J. Immunol. Meth.* 61, 83-89 (1983).

KNIKER, W.T. y COCHRANE, C.G. The localization of circulating immune complexes in experimental serum sickness. The role of vasoactive amines and hydrodynamic forces. *J. Exp. Med.* 127, 119-135 (1968).

KNIKER, W.T., GERRA, F.A. y RICHARDS, S.E.M. Prevention of immune complex disease (serum sickness) by antagonist of vasoactive amines. *Pediatr. Res.* 5, 381 (1971).

KNIKER, W.T. y COCHRANE, C.G. Pathogenic factors in vascular lesions of experimental serum sickness. *J. Exp. Med.* 122, 83-98 (1965).

KORDON, C., BLUET-PAJOT, M.T., CLAUSER, H. DROUVA, S., ENJALBER, A. y EPELBAUM, J. New designs in neuroendocrine systems. *Progress in Brain Res.* 72, 27-29 (1987).

KOTHRY, R.K. y CANDIDO, E.P. Induction of a novel set of polypeptides by heat shock or sodium arsenite in cultured cells of rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Can. j. Biochem.* 60, 347-355 (1982).

KOW, L.M. y PFAFF, D.W. Responses of ventromedial hypothalamic neurons in vitro to norepinephrine: dependence on dose and receptor type. *Brain res.* 413, 220-228 (1987).

- KOW, L.M. y PFAFF, D.W. Neuromodulatory actions of peptides. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28, 163-188 (1988).
- KRIEGER, D. Food and water restriction shifts corticosterone, temperature, activity and brain amine periodicity. *Endocrinology* 95, 1195-1201 (1974).
- KRIEGER, D.T. Brain peptides: what, where and why?. *Science* 222, 985-986 (1983).
- KRIEGER, D.T. Brain peptides. *Science* 222, 275-285. (1983).
- KRUGER, P.D. *Experientia.* 156, 114-116 (1974); Ref en: RIAL, R.V., TUR, J.A. de REQUE, M.C., ESTEBAN, S. y NICOLAU, M.C. *Rev. Esp. Fisiol.* 42, 529 (1986).
- KUNTZ, A. y RICHINS, C.A. Innervation of the bone marrow. *J. Comp. Neurol.* 82, 213-218 (1945).
- LANDRY, J., BERNIER, D., CRETEN, P., NICOLE, L.M., TANGUAY, R.M. y MARCEAU, N. Synthesis and degradation of heat-shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res.* 42, 2457-2461 (1982).
- LANGUNOFF, D. Cell biology and mast cells and basophils. En: "Cell Biology of Inflammation" Ed. G.Waissman. Elsevier/ North Holland. N.Y. 217-266 (1980).
- LANGHOFF, E., LADEFOGED, J. y DICKMEISS, E. The immunosuppressive potency of various steroids on peripheral blood lymphocytes, T cells, NK and, K cells. *Int. J. Immunopharmacol.* 7, 483-489 (1985).
- LA THANGE, N.B., SHRIVER, K., DAWSON, C. y CHAN, W.L. Herpes simplex virus infection causes the accumulation of a heat shock protein. *EMBO J.* 3, 267-277 (1984).
- LAWRENCE, T.S., BEERS, W.H. y GILULA, N.B. Transmission of hormonal stimulation by cell to cell communication. *Nature* 272, 501-506 (1978).
- LEE, W.H., y SEHON, A.H. Suppression of reagenic antibody formation. II.-The use of adaptative transfer system for the study of immunological responsiveness. *J. Immunol.* 114, 837-842 (1975).
- LE FUR, G., PHAN, T. y UZAN, A. Identification of stereospecific 3h-spiroperidol binding sites in mammalian lymphocytes. *Life Sci.* 26, 1139-1148 (1980).
- LEVINE, S., WEINBERG, J. y URSIN, H. Definition of the coping process and statement of the problem. In: "Psychobiology of stress: A studie of coping men". Academy Press. N.Y. 3-21 (1978).
- LEZA, J.C., LIZASOAIN, I. PORTOLES, A., NAVARRO, M. y LORENZO, P. Valoracion del índice de analgesia y la perdida de pes como parámetro de adiccion a la morfina en el raton. *J. Pharmacologie* 14, 555-559 (1983).
- LI, G.C. y WERB, Z. Correlation between synthesis of heat shock proteins and the development of thermotolerance in chinese hamster fibroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3218-3222. (1982).

- LI, G.C. Induction of thermotolerance and enhanced heat shock protein synthesis in chinese hamsters fibroblast by sodium arsenite and by ethanol. *J. cell. Physiol.* 115, 116-122 (1983).
- LI, G.C. y LASZLO, A. En: Changes in eukariotics gene expression in response to enviromental stress". London Academic. 227-254 (1985).
- LI, G.C. y LASZLO, A. Aminoacid analogs while inducing heat shock proteins sensitize CHO cells to termal damage. *J. Cell. Physiol.* 122, 91-97 (1985).
- LI, G.C. y LASZLO, A. Thermotolerance in mammalian cells: a possible role for the heat shock proteins, En: "Changes in eukariotic gene expresion in response to enviromental stress". London Academic. 349-371 (1985 a).
- LINDQUIST, S. Varying patterns of protein synthesis during heat shock: implications for regulation. *Dev. Biol.* 77, 463-479 (1980).
- LINDQUIST, S. The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem:* 55, 1151-1191 (1986).
- LINDQUIST, S. Y CRAIG, E.A. The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-677 (1988).
- LINTHICUM, D.S. y FRELINGER, J.A. Acute autoimmune encephalomyelitis in mice. II Susceptibility is controlled by the combination of H2 and histaminy sensibilization genes. *J. Exp. Med.* 155, 31-40 (1982).
- LIVETT, B.G., GEFFEN, L.B. y aUSTIN, L. Axoplasmic transport of 14C-noradrenaline and proteins in splenic nerves. *Nature* 217, 278-279 (1968).
- LIVINAT, S., FELTEN, S.Y., CARLSON, S.L., BELLINGER, D.L. y FELTEN, D.L. Involvement of peripheral and central catecholamine systems in neural-immune interactions. *J. Neuroimmunol.* 10, 5-30 (1985).
- LIZASOAIN, I. Antagonistas opiaceos y morfínodependencia en el ratón . Tesina de Licenciatura. Fac. de Medicina. U.C.M.(1986).
- LOPKER, A., ABOOD, L.G., HOSS, W. y LIONETTI, F.J. Stereospecific muscarinic acetylcholine and opiate receptors in human phagocitic leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* 29, 1361- 1365 (1980).
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.H. y RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951).
- LORENZO, P., PORTOLES Jr. A., BENEIT, J.V., RONDA, E. y PORTOLES, A. Physical dependence to morphine diminishes the interferon response in mice. *Immunopharmacology* 14, 93-100 (1987).
- LUNDBERG, J.M. y HOKFELT, T. Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. *Trends Neurosci.* 6, 325-333 (1983).

MADDEN, J.J. y DONAHOE, R.M. Opiate binding to cells of the immune system. En: "Drugs of abuse and immune function" Ed. Ronald R. Watson, B.S. CRC Press. Boston pags 213-228 (1991).

MAGGIOLO, C. y HUIDOBRO, F. Administration of pellets of morphine to mice: Abstinence syndrome. *Acta Physiol. Lat. Amer.* 11, 70- (1961).

MAGISTRETTI, P.J. y SCHORDERET, M. VIP and noradrenalin act synergistically to increase cyclic AMP in cerebral cortex. *Nature* 308, 280-282 (1984).

MARSHALL, J. y GRAHAME-SMITH, D.G. Evidence against a role of brain 5-OH-tryptamine in the development of physical dependence upon morphine in mice. *J. Pharm. Exp. Ther.* 173, 634-641 (1971).

MARTIN, J.E., SKILLEN, R.G. y DEUBLER, M.J. The action of adrenocorticotrophic hormone on circulating eosinophils in dogs. A proposed screening method for evaluating adrenal cortical function. *Amaer. J. Vet. Res.* 15, 489-495 (1954).

MARTIN, W.R., EADRES, B.C., THOMPSON, J.A., HUPNER, R.E. y GILBERT, P.E. The effect of morphine and nalorphine like drugs in the non-dependent and morphin-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197, 517-532 (1976).

MARQUEZ, E., ROJO, J.M. Y PORTOLES, A. Metodos informaticos de aplicación a Immunofarmacologia. (Comunicación personal) (1990).

MASEK, K., KADLECOVA, O., PETROVICKY, P. The involvement of brain structures in the adjuvant effect of muramyl dipeptide. *Brain Res. Bull.* 15, 443-466 (1985).

MASEK, K. y KADLECOVA, O. Muramyl peptides, serotonergic system and sleep. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 469, 517-521 (1987).

MASON, M.J. y Van EPPS, D. Modulation of IL-1 tumor necrosis factor and C5A-mediated murine neutrophil migration by α -melanocyte-stimulating hormone. *J. Immunol.* 142, 1646-1651 (1989).

MASSON, J.W. A review of psychoneuroendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom. Med.* 30, 576-607 (1968).

Mc CAIN, H.W., LAMSTER, L.B., BOZZONE, J.M. y GRBIC, J.T. Beta-endorphin modulates human immune activity via non-opiate receptors mechanism. *Life Sci.* 3^o1, 1619- (1982).

Mc CASTILL, A.C., HOSKING, C.S. y HILL, D.J. Anaphylaxis following intranasal challenge of mice sensitized with ovalbumin. *Immunology* 51, 669-677 (1984).

Mc CASKILL, A.C., HOSKING, C.S. y HILL, D.J. Grass pollen hypersensitivity in mice. *Immunology* 46, 745-752 (1982).

Mc CORMICK, P.J., KEYS, B.J., PUCCI, C. y MILLIS, A.J.T. Human fibroblast-conditioned medium contains a 100 Kdaltons glucose-regulated cell surface protein. *Cell* 18, 173-182 (1979).

- Mc EWEN, B.S. y PFAFF, D.W. Hormone effects on hypothalamic neurons: analysing gene expression and neuromodulator action. *Trends Neurosci.* 8, 105-108 (1985).
- Mc EWEN, B.S. y BRINTON, R.E. Neuroendocrine aspects of adaptation. *Progress in Brain Res.* 72, 11-26 (1987).
- Mc INTYRE, D.C. Adrenalectomy: protection from kindled convulsion induced amnesia in rats. *Physiol. Behav.* 17, 709-795. (1979).
- MEDAWAR, P.B. y SPARROW, E.M. The effects of adrenocortical hormones, adrenocorticotrophic hormone and pregnancy on skin transplantation immunity in mice. *J. Endocrinol.* 14,240-256 (1956).
- MEHRISHI, J.N., y MILLS, I.H. Opiate receptors on lymphocytes and platelets in man. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 27, 240-243 (1983).
- MELBY, J.C. EGDAHL, R.H. y SPINK, W.W. *J. Lab. Clin. Med.* 56, 50-62 (1960); Ref. en: DANTZER, R. y KELLEY, K.W. Stress and immunity: An integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sci.* 44, 1995-2008 (1989).
- MICCO, D., MEYERS, J.S. y Mc EWEN, B.S. Effects of corticosterone replacement on the temporal patterning of activity and sleep in adrenalectomized rats. *Brain Res.* 200, 206-212 (1980).
- MILLAN, M.J. y HERZ, A. The endocrinology of the opioids. *Int. Rev. Neurobiol.* 26, 1- (1985).
- MILLAN, M.J., TSANG, Y.F., PREEWLOCKI, R., HOLLT, V. y HERZ, A. The influence of foot-shock stress upon brain, pituitary and spinal cord pools of immunoreactive dynorphin in rats. *Neurosci. Lett.* 4, 75-79 (1981).
- MILLER, G.C., MURGO, A.J. y PLOTNIKOFF, N.P. Enkephalin enhancement of active T-cell rosettes from lymphoma patients. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 26, 446-451 (1983).
- MITSUYA, M. YONEKAWA, Y. y NAKATANI, K. *Med. Biol.* 103, 397 (1981); Ref. en: KANETA, S. ISHIZUKI, I., FUJIHARA, E. y MITSUYA, M. Mouse paw anaphylaxis. *J. Immunol. Meth.* 71, 83-95 (1984).
- MOREY, J.E., KAY, N.E., SOLOMON, G.F. y PLOTNIKOFF, N.P. Neuropeptides: conductors of the immune orchestra. *Life Sci.* 41, 527-531 (1987).
- MORGAN, R.W., CHRISTMAN, M.F., JACOBSON, F.S., STORZ, G. y AMES, B.N. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins.
- MORRISON, D. C. y KLINE, L.F. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolisaccharides (LPS). *J. Immunol.* 118, 362-368 (1977).
- MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55-63 (1983).

MOTA, I. y WONG, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci.* 8, 813-817 (1969).

MOTA, I. y PEIXOTO, J.M. A skin-sensitizing end thermolabile antibody in the mouse. *Life. Sci.* 5, 1723-1728 (1966).

MUDGE, A.W., LEEMAN, S.E., y FISCHBACH, G.D. Enkephalins inhibits release of substance P from sensory neurons in culture and decreases action potential duration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 526-530 (1979).

MUNCK, A., GUYRE, P.M. y HOLBROK, N.J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Rev.* 5, 25-44 (1984).

MUÑOZ, J. Production in mice of large volumes of ascitis fluids containing antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95, 757-761 (1957).

MURRAY, D., CODE, Ch.F. y HIGGINS, G.M. Effect of cortisone and ACTH on eosinophils and anaphylactoc shock in guinea pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 75, 201-206 (1950).

NAKAO, K., NAJAI, Y., JINGAMI, H., OKI, S., FUKATA, J. e IMURA, H. Substantial rise of plasma beta-endorphin levels after insulin-induced hypoglycemia in human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49, 838 (1979).

NAKANISHI, S., INOVE, A., KITA, T., NAKAMURA, M., CHANG, A.C.Y., COHEN, S.N. y NUMA, S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin β -lipoprotein precursor. *Nature* 278, 423-427. (1979).

NAVARRO, M. Valoración farmacológica del síndrome de abstinencia a opiáceos en distintos modelos experimentales. Tesos Doctoral. Fac. de Medicina. U.C.M. (1985).

NEUWELT, A. y CLARK, W.K. *Clinical aspects of neuroimmunology.* Willians & Wilkins Co. Baltimore pag. 136-142 (1978).

NEVEU, P.J. Cerebral neocortex modulation of immune functions. *Life Sci.* 42, 1817-1923 (1988).

OBERDAN, L., FOO, M., SACHS, D., SAMELSON, L.E. y BLUESTONE, J.A. Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 1375-78 (1987).

O'DORISIO, M.S. Biochemicla characteristics of receptor for vascular intestinal polypeptide in nervous, endocrine, and immune systems. *Fed. Proc.* 46, 192-195 (1987).

OLDEN, K., PRATT, R.M., JAWORSKI, C. y YAMADA. K.M. Evidence for role of glycoprotein carbohydrates in membrane transport: specific inhibition by tunicamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 791-795 (1979).

ONO, H. y FUKUDA, H. Ventral root depolarization and spinal reflex augmentation by a TRH analogue in the rat spinal cord. *Neuropharmacology.* 21, 739-744 (1982).

- ONSRUD, M. y THORSBY, E. Influence of in vivo hydrocortisone on some human blood lymphocyte subpopulations. I.-Effect on natural killer cells activity. *Scand. J. immunol.* 13, 573-579 (1981).
- OPERMANN, H., LEVENSON, W. y BISHOP, J.M. A cellular protein that associates with the transforming protein of Rous Sarcoma Virus is also a heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 791-795 (1981).
- OPPENHEIM J.J. y GERY, I. Interleukin 1 is more than an interleukin. *Immunol. Today.* 3, 113 (1982).
- OTTAWAY, C.A. y GREENBERG, A.R. Interaction of vasoactive intestinal peptide with mouse lymphocytes: specific binding and the modulation of mitogen responses. *J. Immunol.* 132, 417-423 (1984).
- OSBAND, M. y Mc CAFFREY, R. Solubilization, separation and partial characterization of histamine H1 and H2 receptors from calf thymocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 254, 9970-9972. (1979).
- OVARY, Z. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. *J. Immunol.* 81, 355-357 (1958).
- OVARI, Z., BARTH, W.F. y FAHEY, J.L. The immunoglobulin of mice. III Skin sensitizing activity of mouse immunoglobulins. *J. Immunol.* 94, 410-415 (1965).
- PALKOVITS, M. y BROWNSTEIN, M.J. En: "Handbook of chemical neuroanatomy" Ed. Elsevier vol 4, part 1, 1-71 (1985).
- PALKOVITS, M., MEZEY, E. y FEMMINGER, A. Neuroanatomical basis for the activation of brain monoaminergic system under stress. En: "Catecholamines and stress. Recent avances" Ed. USDIN, KVETNANSKY & KOPIN. Elsevier North Holland; N.Y. P. 21-29 (1980).
- PARKER, C.W. Asthma and rhinitis. En: "Clinical Immunology" Ed. C.w. Parker. W. B. Saunders. Philadelphia. 1372-1432 (1980).
- PARRILLO, J.E. y FAUCI, A.S. Comparison of the effector cells in human spontaneous cellular cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity: Differential sensitivity of effector cells to in vivo and in vitro corticosteroids. *Scand. J. Immunol.* 8, 99-107 (1978).
- PARRILLO, J.E. y FAUCI, A.S. Mechanisms of glucocorticoid action on immune processes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 19, 179-201 (1979).
- PAYNE, A.N. y De NUCCI, G. Anaphylaxis in guinea pigs induced by ovalbumin in vivo and in vitro methods. *J. Pharmacol. Meth.* 17,83-90 (1987).
- PELHAM, H. Heat-shock proteins. Coming in from the cold. *Nature* 332, 776-777 (1988).
- PELUSO, R.W., LAMB, R.A. y CHOPPIN, P.W. Polypeptide synthesis in simian virus 5-infected cells. *J. Virol.* 232, 177-187 (1977).

PELUSO, R.W., LAMB, R.A. y CHOPPIN, P.W. Infection with paramyxoviruses stimulates synthesis of cellular polypeptides that are also stimulated in cells transformed by Rus Sarcoma Virus or deprived of glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 6120-6124 (1978).

PETKOV, V. y STANEVA-STOICHEVA, D. The effect of an extract of Ginseng on the adrenal cortex. *Proc. 2nd Internat. Pharmacol. Meet. (Prague)* en: *Czechoslovak Med Press* 7, 39-45 (1965).

PIECHUTA, H., SMITH, M., SNARE, N. y HOLME, G. The respiratory response of sensitized rats to challenge with antigen aerosols. *Immunology* 38, 385-393 (1979).

PILOT, M.L. Use of base in fluids for counting eosinophils. *Amer. J. Clin. Path.* 20, 870-875 (1950).

PIPER, P.J. y VANE, J.R. Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs. *Nature*. 223, 29-35 (1969).

PITKIN, D.H. Effect of physiological stress on delayed hypersensitivity reaction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120, 350-351 (1965).

PLATA-SALAMAN, C.R., COMURA, Y. y KAI, Y. Tumor necrosis factor and interleukin-1 β suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain.Res.* 448,106-114 (1988).

PLAUT, M. y LICHTENSTEIN, L.M. Cellular and chemical basis of the allergic inflammation response: Component parts and central mechanism. En: "Allergy: Principles and Practice" Ed. E. Middleton, C.E. Reed & E.F. Ellis C.V. Mostley St. Louis. 115-138 (1978).

PLOTNIKOFF, N.P., MILLER, G.C. y WYBRAN. J. ACTH and endorphins. En : "hormones and immunity" Eds. I. Berczi & K. Kovacs. MTP Press Ltd. Lancaster 130-144 (1986).

PLOTNIKOFF, N.P., MURGO, A.J., MILLER, G.C., CORDER, C.N. y FAITH, R.E. Enkephalins: Immunomodulators. *Fed. Proc.* 40, 118-122 (1985).

PLOTNIKOFF, N.P. Y MURGO, A.J. Enkephalines and endorphins: Stress and immune system. *Fed. Proc.* 44, 91-122 (1985).

POLLOCK, R.E., LOTZOVA, E., STANFORD, S.D. y ROSENTHAL, M.M. Effect of surgical stress on murine natural killer cell cytotoxicity. *J. Immunol.* 138, 171-178 (1987).

PORTOLES, A., OJEDA, G., PORTOLES, M.P. y ROJO, J.M. Effects of several neuroleptic compounds on the blastogenic response of spleen cells from mice. *Int. J. Tiss. Reac.* 4, 133-140 (1982).

PORTOLES, A., ROJO, J.M. y DIAZ, R. Cuantificación (por normogramas) de parámetros fisiopatológicos en un modelo experimental de anafilaxia pasiva por inmunocomplejos. *Rev. España. Fisiol.* 40, 297-310 (1984).

PORTOLES, A., ROJO, J.M. y DIAZ, R. Influence of mouse genotype on passive systemic anaphylaxis by immune complexes. *Infect. & Immun.* 54, 882-885 (1986).

- PORTOLES, A. y MARQUEZ, E. NKCELPRO: Programa para microordenador aplicable al estudio de respuestas e citotoxicidad espontánea. *Rev. Esp. de Fisiol.* 43, 503-514 (1987).
- PORTOLES, A. Jr. *Modulación farmacológica en ratones inmunodeprimidos por morfinodependencia experimental*. Tesis Doctoral. Fac. de Medicina U.C.M. (1990).
- PORTOLES, J. *Modulación farmacológica en anafilaxia pasiva experimental por inmunocomplejos anti-endotoxina*. Tesina de licenciatura. Fac. de Medicina U.C.M. (1988).
- POUYSSSEGUR, J., SHIU, R.P.C. y PASTAN, I. Induction of two transformation-sensitive membrane polypeptides in normal fibroblast by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation. *Cell.* 11, 941-947 (1977).
- PROUVOST-DANON, A., SILVA LIMA, M. y QUEIROZ JAVIERRE, M. Active anaphylactic reaction in mouse peritoneal mast cells in vitro. *Life Sci.* 5, 289-292 (1966).
- RAIMOND, F., MOREL, E. y BACH, J.F. Evidence for the presence of immune reactive acetylcholine receptors on human thymus cells. *J. Neuroimmunology.* 6, 31-40 (1984).
- REDGATE, E.S., DEUPREE, J.D. y AXELROD, J. Interaction of neuropeptides and biogenic amines on cyclic adenosinmonophosphate accumulation in hypothalamic nuclei. *Brain Res.* 305, 61-69 (1986).
- REILLY, F.D., Mc CUSKEY, R.S. y MEINEKE, H.A. Studies of the thimopoietic microenvironment. *Anat. Rec.* 185, 109-117 (1976).
- RENOUX, G., BIZIERE, K. y RENOUX, M. Le neocortex cerebral contrôle le système immunitaire. *Bull. Acad. Nat. Med.* 166, 61-68 (1982).
- RENOUX, G., BIZIERE, K., RENOUX, M. y GUILLAUMIN, J.M. Le cortex cérébral règle les réponses immunes des souris. *C. R: Acad. Sci. Paris* 290 D, 719-722 (1980).
- RENOUX, G., BIZIERE, K., RENOUX, M. y GUILLAUMIN, J.M. A balanced brain asymmetry modulates T cell-mediated events. *J. Neuroimmunol.* 5, 227-238 (1983).
- RENOUX, G. y RENOUX, M. Diethyldiethiocarbamate (DTC). A biological augmentin agent specific for T cells. En: "Immune modulating agents and their mechanism". Eds. R.L. FENICHEL y M.A. CHIRIGOS. Marcel Decker, Inc. N.Y. pag 7-20 (1984).
- RIAL, R.V., TUR, J.A., De ROQUE, M.C., ESTEBAN, S. y NICOLAU, M.C. Efectos de la inyección intracerebroventricular de histamina sobre el comportamiento de la rata blanca. *Rev. Española Fisiol.* 42, 529-534 (1986).
- RISCH, S.C., KALIN, N.H., JANOWSKY, D.S., COHEN, R.M., PICKAR, D. y MURPHY, D.L. Co-release of ACTH and β -endorphin immunoreactivity in human subject in response to central cholinergic stimulation. *Science*, 222, 77 (1983).
- ROBERTS, V.J., SINGHAL, R.L. y ROBERTS, D.C. Corticosterone prevents the increase in noradrenaline-stimulated adenylcyclase activity in rat hippocampus following adrenalectomy or metopirone. *Eur. J. Pharmacol.* 103, 235-240 (1984).

- ROBERTSON, R.P. Characteristics and regulation of prostaglandin and leucotriene receptors: an overview. *Prostaglandins* 31, 395-411 (1986).
- ROCKLIN, R.E. Modulation of cellular-immune responses in vivo and in vitro by histamine receptor-bearing lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 57, 1051-1058 (1976).
- ROCKLIN, R.E., GREINER, D.K. y MELMON, K.L. Histamine-induced suppressor factor (HSF): Further studies on the nature of the stimulus and the cell which produces it. *Cell. Immunol.* 44, 404-415 (1979).
- ROCKLIN, R.E., BENDTZEN, K. y GREINER, D. Mediators of immunity: lymphokines and monokines. *Adv. Immunol.* 29, 55-136 (1980).
- ROJO, J.M., OJEDA, G., PORTOLES, M.P. y PORTOLES, A. Inhibition of T and B lymphoblastic response by mithramycin, darbazine, prospidium chloride and peptichemio. *Chemotherapy* 29, 345-351. (1983a).
- ROJO, J.M., REJAS, M.T., OJEDA, G., PORTOLES, M.P. y BARASOAIN, I. Enhancement of lymphocyte proliferation, interleukine-2 production and Nk activity by Immunoferon (AM-3), a fungal immunomodulator: variations in normal and immunosuppressed mice. *Int. J. Immunopharmac.* 8, 593-597 (1986).
- ROSNER, I.K., COLTEN, H.R. y EDELSON, P.J. Human monocytes have binding sites for histamine. *Conf. Soc. Pediatric. Res. Atlanta Georgia* (1979).
- ROSSIER, J., FRENCH, E.D., RIVIER, C., LING, N. GUILLEMIN, R. y BLOOM, F.E. Foot-shock induces stress increases beta-endorphin levels in blood but not in brain. *Nature (London)* 270, 618 (1977).
- ROSZMAN, T.L., CROSS, R.J., BROOKS, W.H. y MARKESBERY, W.R. Hypothalamic-immune interactions. II. The effect of hypothalamic lesions on the ability of adherent spleen cells to limit lymphocyte blastogenesis. *Immunology* 45, 737-742 (1982).
- ROUGON, G., NOBLE, M. y MUDGE, A.W. Neuropeptides modulate beta-adrenergic response of purified astrocytes in vitro. *Nature* 305, 715-717 (1983).
- SANDLER, J.A., CLYMAN, R.I., MANGANIELLO, V.O. y VAUGHN, M. The effect of serotonin (5-hydroxytryptamine) and derivatives on guanosin-3'5' monophosphate in human monocytes. *J. Clin. Invest.* 55, 431-435 (1975).
- SANDERS, V.M. y MUSON, A.E. Norepinefrine and the antibody response. *Pharmacol. Rev.* 37, 229-248 (1985).
- SAPOLSKY, R. A mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus: increased neuronal vulnerability to metabolic insults. *J. Neurosci.* 5, 1228-1232 (1985).
- SAPOLSKY, R. y PULSINELLI, W. Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. *Science* 229, 1397-1399 (1985).
- SAPOLSKY, R. Glucocorticoid toxicity in hippocampus: temporal aspects of synergy with Kainic acid. *Neuroendocrinology* 43, 440-444 (1986).

- SAPOLSKY, R. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: reversal by supplementation with brain fuels. *J. Neurosci.* 6, 2240-2244 (1986 a).
- SAPOLSKI, R., RIVER, C., YAMAMOTO, G., PLOTSKI, P. y VALE, W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science.* 238, 522-524 (1987).
- SATO, K., FLOOD, J.F. y MAKINODAN, T. Influence of conditioned psychological stress on immunological recovery in mice exposed to low dose X-radiation. *Rad. Res.* 98, 381-388 (1984).
- SCHALM, O.W., JAIN, N.C. y CARROL, E.J. *Veterinary Hematology.* Eds. Lea & Febiger. Philadelphia. pag.247-253 (1975).
- SCHWEIGERER, L., BHAKDI, S. y TESCHEMACHER, H. Specific non-opiate binding sites for human beta-endorphin on the terminal complex of human complement. *Nature* 296, 572- (1982).
- SCHLEIFER, S.J., KELLER, S.E., CAMERINO, M., THORTON, J.C. y STEIN, M. Suppression of lymphocyte stimulation following bereavement. *J. AM. Med. Assoc.* 250, 374-377 (1983).
- SELKIRK, M.E., RUTHERFORD, P.J., DENHAM, D.A., PARTONO, F. y MAIZELS, R.M. Cloned antigen genes of *Brugia filarial* parasites. *Biochem. Soc. Symp* 53, 91-102 (1987).
- SELVE, H. "Stress. The Physiology and Pathology of Exposure to Stress" *Acta Medica Pbl.*, Montreal (1950).
- SHAVIT, Y., LEWIS, J.W., TERMAN, G.W., GALE, R.P. y LIEBESKIND, J.C. Opioid peptide mediate the suppressive effects of stress on natural killer cell cytotoxicity. *Science* 223, 188-190 (1984).
- SHAVIT, Y., TERMAN, G.W., MARTIN, F.C., LEWIS, J.W., LIEBESKIND, J.C. y GALE, R.P. Stress, opioid peptides, the immune system, and cancer. *J. Immunol.* 135, 834 (1985).
- SHAVIT, Y., TERMAN, G.W., LEWIS, J.W., ZANE, C.J., GALE, R.P. y LIEBESKIND, J.C. Effects of footshock stress and morphine on natural killer lymphocytes in rats: studies of tolerance and cross tolerance. *Brain Res.* 372, 382-384 (1986).
- SHAVIT, Y., De PAULIS, A., MARTIN, F.C., TERMAN, G.W. et al. Involvement of brain opiate receptors in the immune-suppression effect of morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7114-7116 (1986).
- SHAPIRA, R., SILBERBERG, S.D., GINSBURG, S. y RAHAMIMOFF, R. Activation of Protein-kinase-C augments evoked transmitter release. *Nature.* 325, 58-60 (1987).
- SHIMIZU, K., AMAYA, S. y OGIHARA, Y. Analysis of corticosterone in the serum of mice and rats using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography.* 272, 170-175 (1983).
- SHORTLAND, L. Y SHORE, N. Active bronchial anaphylaxis in the rat. *Can.J. Pharmacol.* 52, 1114-1118 (1974).

- SIBINGA, N.E.S. y GOLDSTEIN, A. Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 6, 219-249 (1988).
- SKALAR, L.S. y ANISMAN, H. Stress and coping factors influence tumor growth. *Science* 205, 513-515 (1979).
- SMELICK, P.G. Adaptation and brain function: *Progress in Brain Res.* 72, 3-9 (1987).
- SMITH, P.L. KAGLY-SOBOTKA, A., BLIECKES, E.R., TRAYSTAMAN, R., KAPLAN, A.P, et al: Physiological manifestation of human anaphylaxis *J. Clin. Invest.* 66, 1072-1080 (1980).
- SMITH, E.M., MEYER, W.J. y BLALOCK, J.E. Virus-induced corticosterone in hypophysectomized mice: A possible lymphoid adrenal axis. *Science* 218, 1311-1313 (1982).
- SMITH, D.F., SEARLE, S., CAMPO, A.J.R., COULSON, R.M.R. y READY, P.D. A multigene family in *Leishmania major* with homology to eukariotic heat shock proteins 70 genes. *J. Cell. Biochem.* 12D: Supplement. 296 /1988).
- SNARY, d., GOODFELLOW, P., BODMER, W.F. y CRUPTON, M.J. H-2 linked Ss protein is C4 component of complement. *Nature (London)* 258, 243-244 (1975).
- SOLOMON, G.F. "Psychoneuroimmunology". *Academis Press. N.Y.* p. 259-278 (1981).
- SOKOLOV, E.N. "The central nervous system and behaviour" *Trans 3rd Conf. Josiah Macy Foundation, N.Y.* (1968).
- STANISZ, A.M. BEFUS, D. y BIENENSTOCK, J. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin immunoglobulin synthesis and proliferation by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *J. Immunol.* 136, 152-156. (1986).
- STONE, e. Problems with current catecholamine hypotheses of antidepressant agents: speculations leading to a new hypothesis. *Behav. Brain Res.* 6, 535-577 (1983).
- STEIN, M., KELLER, S.E. y SCHLEIFER, S.J. Stress and immunomodulation: the role of depression and neuroendocrine function. *J. Immunol.* 135, 827s-833s (1985).
- SUAREZ PEREGRIN, e. "Manual Técnico de Análisis Clínicos". Granada 7ª Ed. (1960).
- SULIVAN, T.J. y KULCYCKI, A.K. Jr. Immediate hypersensitivity response. En: "Clinical Immunology" Ed. C.W. Parker. W.B. Sanders. Philadelphia. p.115-142 (1980).
- SYDBON, A. y TEREINIUS, L. The histamin-releasing effect of dynorphin and other peptides possessing Arg-Pro sequences. *Agents and Actions* 16, 269-272 (1985).
- SYDBON, A. Mast cells and neuropeptides. Effects of beta-endorphin on rat mast-cells. *Agents and Actions* 23, 204-206 (1988).
- SYNDER, S.H. Drug and neurotransmitter receptors in the brain *Science.* 224, 22- (1984).

- TOBLER, I., BORBELY, A.A., SCHWYZER, M. y FONTANA, A. Interleukin-1 derived from astrocytes enhances slow wave activity in sleep EEG of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 104, 191-192 (1984).
- TONNAER, J.A.D.M., Van VUGT, M. y De GRAAF, J.S. In vitro interaction of ACTH with rat brain muscarinic receptors. *Peptides* 7, 425-429 (1986).
- TORES-ALEMAN, I., REJAS, M.T., BARASOAIN, I., BORRELL, J. y GUAZA, c. Corticosterone-releasing activity of immune mediators *Life Sci.* 40, 929-934 (1987).
- TUNG, A.P., SHYR-TE, J., SATO, S. y NISONOFF, A. Production of large amounts of antibodies in individual mice. *J. Immunol.* 116, 676-684 (1976).
- TURNER, R.A. The organization of screening. En: "Screening methods in Pharmacology". Acad. Press. N.Y. p 22-41 (1965).
- VASWANI, K.K., TEJWANI, G.A. y ABU-ISSA, H.M. Effect of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary carcinogenesis on the opioid peptide levels in the rat central nervous system. *Cancer Lett.* 331, 115-122 (1986).
- VELDHUIS, H., De KLOET, E.R., VaN ZOEST, I. y BOHUS, B. Adrenalectomy reduces exploratory activity in the rat: a specific role of corticosterone. *Horm. Behav.* 16, 191-198 (1982).
- VILAIN, B., LAGENTE, V., TOUVAY, C., DESQUAND, S., RANDON, J., LEFORT, J., BRAQUET, F. y VARGAFTIG, B.B. Pharmacological control of the in vivo passive anaphylactic shock by the PAF-acether actagonist compound BN 52021. *Pharm. Res. Comm.* 18,Sup. 119-126 (1986).
- VODKIN, M.H. y WILLIAMS, J.C. A heat shock operon in *Coxiella Burnetii* produces a major antigen homologous to a protein in both mycobacteria and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 1227-1234 (1988).
- WARDLAW, S.L. y FRANTZ, A.G. Effects of swimming stress on brain beta-endorphins and ACTH. *Clin. Res.* 28, 482a (1980).
- WATSON, S.P., CORNELL, R.Mc. y LAPETINA, E.G. The rapid formation of inositol phosphates in human platelets stimulated by thrombin is inhibited by prostacycline. *J. Biol. Chem.* 259, 13199-13203 (1984).
- WEBER, R.J., IKEJIRI, B., RICE, K.C., PERT, A., y HAGAN, A.A., Opiate receptore mediated regulation of the immune response "in vivo". en "Problems of Drugs Dependence". Harris L.S. Ed. "National Institute on Drugs Abuse Reseach Monograph Ser." n°76 Whasintong D.C. (1987).
- WECK, A.L. "Allergic reactions to drug" Ed. A.L. de Weck & H. Bundgaard. Springer-Verlag. Berlin. p. 89-103 (1983).
- WEIGENT, D.A. y BLALOCK, J.E. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormone and receptors. *Immunol. Rev.* 100, 79,-108 (1987).

- WEISS, M.N. Effects of coping responses on stress. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 65, 251-260 (1968).
- WERZ, M.A. y Mc DONALD, R.L. Opioids with differential affinity to μ and δ receptors decrease sensory neuron calcium-dependent potentials. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227, 394-402 (1983).
- WEXLER, B.C., DOLGIN, A.E. y TRYCZYNSKI, E.W. Effects of a bacterial polysaccharide (piromen) on the pituitary-adrenal axis: Further aspects of hypophyseal-mediated control of response. *Endocrinology* 61, 448-499 (1957).
- WILLIAMS, R.C. Jr. "Immunocomplexes in Clinical and Experimental Medicine". Cambridge, Mas. Harvard Univ. Press. p.548 (1980).
- WILLNER, P. Dopamine and depression: a review of recent evidence. II. Theoretical approaches. *Brain Res. Rev.* 6, 225-236 (1983).
- WILSON, S.P., KLEIN, R.L., CHANG, K.L., GASPARIS, M.S., VIVEROS, O.H. y YANG, W.H. Are opioid peptides co-transmitters in nonadrenergic vesicles of sympathetic nerves? *Nature*, 288, 707-709 (1980).
- WINTER, C.A., RISLEY, E.A. y NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 544-548 (1963).
- WOOLFF, G. y Mc DONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine HCL (Demerol) *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 80, 300 (1944).
- WYBRAN, J., APPELBOOM, T., FAMEY, J.P. y GAVAERTS, A. Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine-enkephalin on normal human blood T lymphocytes. *J. Immunol.* 123, 1068- (1979).
- WYBRAN, J. Enkephalins and endorphins as modifiers of the immune system: present and future. *Fed. Proc.* 44, 92-94 (1985).
- YAKSH, T.L., TERENIUS, L., NYBERG, F., JHAMANDAS, K. y WANG, J.Y. Studies on the release by somatic stimulation from rat and cat spinal cord of active materials which displace dihydromorphine in an opiate-binding assay. *Brain Res.* 268, 119-128 (1983).
- YARBROUGH, G.G. Mini-review: thyrotropin releasing hormone and cholinergic neurons. *Life Sci.* 33, 111-118 (1983).
- YOUNG, D., LATHIGRA, R., HENDRIX, R., SWEETSER, D. y YOUNG, R.A. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4267-4270 (1988).
- ZUKIN, R.S. y ZUKIN, S.R. Multiple opiate receptors: emerging concepts. *Life Sci.* 29, 2681-2690 (1981).