

Trabajo Original

Agonistas dopaminérgicos y su impacto en la secreción de IL-6 e IL-8 en queratinocitos

Impact of dopamine agonists on the secretion of IL-6 and IL-8 in keratinocytes

Lic. Andrea Cecilia Parrado; Dra. Andrea Canellada; Dra. Teresa Gentile y Dra. Estela B. Rey Roldán

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Prof. Dr. R.A. Margni (CONICET-UBA)

Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires, Argentina

Junín 956, 4° piso, Capital Federal - E-mail: estelar@ffyb.uba.ar

Resumen

La dopamina, neurotransmisor catecolaminérgico, regula diversas funciones en los sistemas nervioso, neuroendocrino e inmune. A nivel de la piel modularía la actividad de los queratinocitos, células que participan activamente en las defensas del sistema inmune cutáneo, induciendo la secreción de citoquinas/quimioquinas. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre la producción de las citoquinas IL-6 (proinflamatorias) e IL-8 (quimiotácticas) en una línea celular no tumoral de queratinocitos humanos, HaCaT.

Las células fueron estimuladas con dopamina y cabergolina, agonistas de los receptores dopaminérgicos de tipo D2. Se cuantificaron IL-6 e IL-8 en los sobrenadantes de cultivo (ELISA) y se evaluó la proliferación celular. El estudio se realizó en presencia o ausencia de antagonistas de los receptores dopaminérgicos (sulpirida) y β -adrenérgicos (propranolol) y del antioxidante ácido ascórbico (0,1 mM).

Demostramos que la dopamina estimuló significativamente la liberación de IL-6 e IL-8 en forma dependiente de la dosis. El efecto observado sobre la IL-6 fue de mayor magnitud que el inducido sobre la IL-8, y el ácido ascórbico lo redujo. La acción estimuladora de la dopamina sobre la producción de IL-6 fue parcialmente reducida por la sulpirida y bloqueada por el propranolol. Este último también bloqueó el efecto de la dopamina sobre la secreción de IL-8. La cabergolina incrementó la producción de IL-6, efecto que fue reducido por la sulpirida. La viabilidad celular no fue alterada por los tratamientos.

Nuestros resultados demuestran que los agonistas dopaminérgicos pueden estimular en los queratinocitos la producción de IL-6 e IL-8, citoquinas relacionadas con procesos inflamatorios cutáneos. Los efectos estarían mediados por receptores dopaminérgicos y β -adrenérgicos que involucran también procesos oxidativos independientes de receptores.

Palabras clave: agonistas dopaminérgicos, citoquinas, IL-6, IL-8, queratinocitos

Abstract

The catecholaminergic neurotransmitter dopamine regulates functions of the nervous, neuroendocrine and immune systems. Dopamine may modulate the activity of keratinocytes, cells that are actively involved in cutaneous immune system defenses, inducing the secretion of cytokines/chemokines. The aim of this study was to evaluate the effect of dopaminergic agonists on the production of IL-6 (proinflammatory) and IL-8 (chemokine) by a non-tumoral human keratinocyte cell line (HaCaT).

Cells were stimulated with dopamine and cabergoline, D2 dopamine receptor agonist. Levels of IL-6 and IL-8 in culture supernatants were then determined. Cell proliferation was measured also assessed. Assays were carried out in the presence or absence of the dopaminergic and β -adrenergic receptors antagonists sulpiride and propranolol, respectively, and the antioxidant ascorbic acid (0.1M).

We demonstrate that dopamine significantly stimulated the production of IL-6 and IL-8 in a concentration-dependent manner. The effects observed on the secretion of IL-6 were more potent than those corresponding to IL-8 and were reduced by ascorbic acid. The dopamine-induced IL-6 secretion was partially reduced by sulpiride and abrogated by propranolol. The latter drug was able to block the effect of dopamine on the secretion of IL-8. The cabergoline-induced IL-6 release was reduced by sulpiride. Cell viability was not affected by any of the drugs.

Our findings show that dopaminergic agonists can stimulate keratinocytes to produce IL-6 and IL-8 which are related to inflammatory cutaneous processes. These effects would be mediated by dopaminergic and β -adrenergic receptors and by receptor-independent oxidative mechanisms.

Key words: dopamine agonists, cytokines, IL-6, IL-8, keratinocytes.

Introducción

La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico que regula múltiples funciones del sistema

nervioso central (actividad locomotora, conducta, etc.) y ejerce un rol fundamental en el sistema neuroendocrino, controlando la secreción hormonal adenohipofisaria. A nivel periférico, la dopamina se ha identificado como un regulador crítico de diferentes funciones fisiológicas, entre ellas cardiovasculares, renales, gastrointestinales. De particular interés es su rol inmunorregulatorio, dado que la interacción entre los sistemas nervioso e inmune puede modular el tipo de respuesta inmunológica que se desarrollará frente a una infección (1-3). Por ejemplo, en individuos esquizofrénicos o con enfermedad de Parkinson, cuya actividad dopaminérgica central se encuentra alterada, se han descrito cambios en la funcionalidad de la población linfocitaria T (4).

Numerosas células del sistema inmune expresan receptores para neurotransmisores (5). Entre ellos, la dopamina puede modular la proliferación, diferenciación, apoptosis o producción de citoquinas en células inmunes a través de su interacción con receptores catecolaminérgicos (dopaminérgicos D1 a D5, α y β -adrenérgicos) expresados en la superficie de células inmunes y también mediante mecanismos oxidativos intracelulares (6). En general, se observa que los agonistas dopaminérgicos tienen la capacidad de inducir o suprimir la producción de citoquinas de acuerdo con el tipo celular involucrado y su estado fisiopatológico. Se sugiere que las concentraciones bajas de dopamina ejercen su efecto en receptores dopaminérgicos, mientras que las concentraciones elevadas lo hacen a través de receptores adrenérgicos (7,8).

Las citoquinas juegan un rol fundamental en la regulación del sistema inmune y en la comunicación entre células. Algunas, como IL-6 e IL-8, citoquinas proinflamatoria y quimiotáctica respectivamente, son producidas por varios tipos celulares, ya sean inmunes o no inmunes, tales como queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos, etc. Las alteraciones en la regulación de IL-6 se han relacionado con procesos proliferativos anormales tanto malignos (9,10), como en la patogénesis de algunas enfermedades inflamatorias (11-12), en la cicatrización de heridas y en la formación de queloides (13). Con respecto a la IL-8, su principal función es la atracción de neutrófilos hacia los focos inflamatorios, no obstante, está involucrada también en procesos angiogénicos fisiológicos y patológicos (14-15). Recientemente se ha demostrado que los queratinocitos de pacientes psoriásicos producen altos niveles de IL-8 (16) y se ha prestado atención a la neovascularización de la piel en estadios tempranos del desarrollo de esta enfermedad como potencial blanco terapéutico (17).

Dentro del sistema inmune cutáneo, los queratinocitos se interrelacionan con células inmunes residentes en el tejido, como linfocitos, células de Langerhans y macrófagos, lo que contribuye especialmente a la inmunidad

innata e inflamación. La exposición de los queratinocitos a agentes inflamatorios y agresiones del medioambiente induce la secreción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas (p. ej., IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18) que actúan en forma autocrina y paracrina (18,19). Los queratinocitos poseen la capacidad de sintetizar y degradar catecolaminas y expresar receptores dopaminérgicos y adrenérgicos (20,21). Recientemente se ha involucrado a los receptores adrenérgicos y las catecolaminas endógenas en la etiopatogenia de enfermedades inflamatorias de la piel como vitíligo, psoriasis y dermatitis atópica (20,22,23), así como también en la regulación de la cicatrización de las heridas (24,26). Sin embargo, no se ha estudiado en profundidad la participación de las vías dopaminérgicas en la fisiopatología del sistema inmune cutáneo.

Hemos mencionado que las catecolaminas pueden regular la función inmune a través de procesos oxidativos, además de su acción mediada por la interacción con receptores catecolaminérgicos. Los queratinocitos poseen numerosos sistemas antioxidantes (enzimas y moléculas como el tocoferol, glutatión y ácido ascórbico) que los protegen de los daños oxidativos generados por factores ambientales (27). Por ejemplo, se ha demostrado en queratinocitos humanos de la línea celular HaCaT la presencia de sistemas eficaces de acumulación intracelular de ácido ascórbico (28). Estas células no tumorigénicas constituyen un excelente modelo para estudios fisiológicos, presentan características fenotípicas similares a las de los queratinocitos normales (29,30).

Objetivo

En este trabajo nos propusimos evaluar la acción de la dopamina y del agonista dopaminérgico cabergolina en la regulación de la producción de IL-6 e IL-8 en queratinocitos humanos. Estudiamos además si el efecto estaba mediado por receptores dopaminérgicos/ β -adrenérgicos o mecanismos oxidativos, empleando antagonistas de los receptores catecolaminérgicos y ácido ascórbico como antioxidante. La elección de la cabergolina obedece a su capacidad de unión específica a receptores dopaminérgicos de tipo D2, mínima afinidad por receptores adrenérgicos y de amplio uso clínico.

Materiales y métodos

Cultivo celular y tratamiento

Se utilizaron queratinocitos HaCaT, línea celular epitelial humana no tumorigénica, gentilmente cedidos por el Profesor N. E. Fusening, del *German Cancer Research Center* (Heidelberg, Germany). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 UI/ml penicilina, 100 ug/ml estreptomina, 2 mM piruvato y 2 mM glutamina en estufa humidificada a 37 °C con 5% de CO₂ hasta llegar a subconfluencia.

Los queratinocitos ($1,10^4$ células/pocillo en placas de 96 fosas) fueron estimulados con distintas concentraciones de agonistas dopaminérgicos: dopamina (Sigma, Mo, USA), 10^{-4} a 10^{-7} M, o cabergolina (donada por Laboratorios Beta, Argentina), 10^{-4} y 10^{-5} M. Las incubaciones se realizaron en presencia o ausencia de ácido ascórbico 0,1 mM y en presencia o no de antagonistas de receptores dopaminérgicos: haloperidol (Sigma, 10^{-4} M), sulpirida (Vipral, Laboratorio IVAX Argentina, 10^{-4} M) y antagonistas de receptores β -adrenérgicos (propranolol, Imperial Chemical England, 10^{-5} M) e incubados durante 24 h. Los antagonistas fueron agregados 1 hora antes de la estimulación con dopamina o cabergolina. Al finalizar la incubación se tomó el sobrenadante y se congeló a -80 °C para la posterior determinación de citoquinas. Los experimentos se repitieron 4-5 veces.

Proliferación celular y viabilidad

Para evaluar la proliferación celular, luego de 24 h de incubación se agregó al cultivo una sal de tetrazolium (WST-1, Roche) y se lo incubó en atmósfera humidificada a 37 °C y 5% pCO_2 durante 1 hora. Se cuantificó la producción de formazán, obtenido por clivaje mitocondrial de la sal, midiendo la densidad óptica a 450 nm en un lector de ELISA (Meterterch $\Sigma 960$).

Cuantificación de citoquinas

La concentración de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo fue determinada utilizando equipos comerciales de ELISA de captura, específicos para IL-6 humana (R&D Systems) e IL-8 humana (BD OptEIA, Biosciences) acorde con las instrucciones del fabricante. Las lecturas se efectuaron a $450-600$ nm usando un lector de ELISA (Meterterch $\Sigma 960$). La concentración de la proteína en la muestra fue determinada por interpolación en la curva estándar. El límite de detección fue de $2,3$ y $4,0$ pg/ml respectivamente.

Análisis estadístico

El efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre la producción de citoquinas se analizó utilizando análisis de la varianza de dos vías (ANOVA) seguido del test a posteriori de Bonferroni. Para analizar el efecto de los antagonistas sobre la producción de citoquinas inducida por agonistas dopaminérgicos, se empleó ANOVA de una vía seguido del test a posteriori de Student-Neuman-Keuls. Se consideró significativo un $p < 0,05$.

Resultados

1. Efecto de agonistas dopaminérgicos sobre la producción de IL-6 en células HaCaT

Para estudiar el efecto basal de dopamina y de cabergolina, agonista dopaminérgico de alta afinidad por receptores dopaminérgicos de tipo D2, sobre

la producción de IL-6, los queratinocitos se estimularon con diferentes concentraciones de dopamina (10^{-7} a 10^{-4} M) y de cabergolina (10^{-5} a 10^{-4} M) durante 24 h.

Como puede observarse en la Figura 1A, la secreción de IL-6 se incrementó gradualmente en el sobrenadante de cultivo a medida que aumentó la dosis de dopamina y alcanzó niveles significativos con concentraciones de 10^{-5} M y 10^{-4} M. Este efecto disminuyó en presencia del antioxidante ácido ascórbico 0,1 mM. No se observaron diferencias significativas en la producción basal de IL-6 en presencia o no del antioxidante ($23,83 \pm 1,49$ pg/ml y $34,07 \pm 3,69$ pg/ml, respectivamente).

El agonista dopaminérgico cabergolina también incrementó significativamente la producción de IL-6. A diferencia de la dopamina, se logró a una mayor concentración (10^{-4} M), el efecto máximo fue de menor magnitud, y no se observaron diferencias en la producción de citoquinas cuando las células fueron tratadas con cabergolina en presencia de ácido ascórbico 0,1 mM (FIGURA 1B).

Ninguno de los tratamientos alteró la viabilidad celular medida con el reactivo colorimétrico WST-1 (datos no mostrados).

Para evaluar el tipo de receptor catecolaminérgico que está mediando el aumento en la producción de citoquinas inducido por los agonistas dopaminérgicos, utilizamos sulpirida, un antagonista dopaminérgico D2

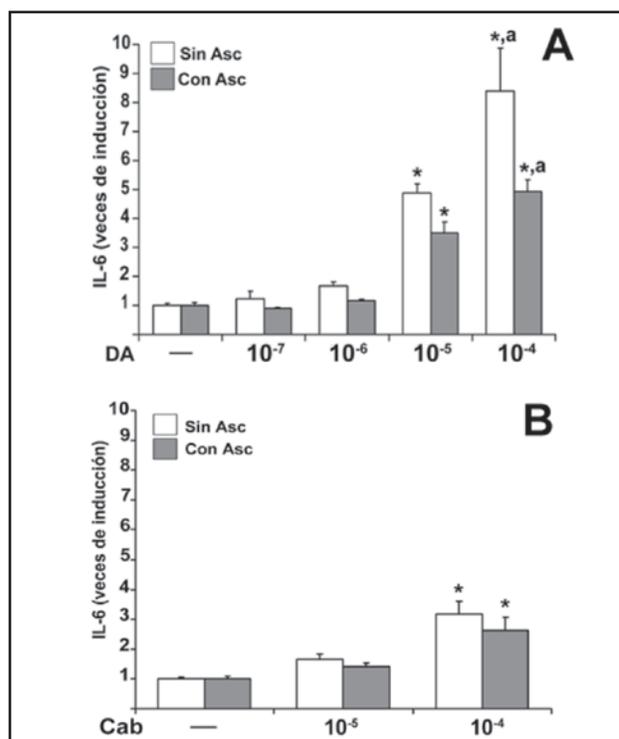


FIGURA 1. Efecto de los agonistas dopaminérgicos dopamina (DA) y cabergolina (cab) sobre la producción de IL-6 en cultivos de células HaCaT, luego de 24 h de cultivo, en ausencia (Sin Asc) y presencia de ácido ascórbico 0,1 mM (Con Asc). Los valores de citoquinas se expresan como veces de inducción con respecto al control (al que se le asigna el valor de 1) \pm error estándar. * $p < 0,05$ vs. control, a: $p < 0,05$ vs. dopamina sin Asc.

que no presentó efectos tóxicos sobre las células HaCaT, a diferencia del haloperidol, que en concentración 10^{-4} M disminuye la viabilidad celular (datos no mostrados). La sulpirida (10^{-4} M) disminuyó parcial pero significativamente la producción de IL-6 cuando los queratinocitos fueron tratados con dopamina 10^{-5} M en ausencia de ácido ascórbico, condición en la que se alcanza el máximo incremento (FIGURA 2A). La sulpirida 10^{-4} M también disminuyó significativamente la secreción de IL-6 inducida por la cabergolina 10^{-4} M (FIGURA 2B).

Con el objeto de determinar si el efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre la producción de citoquinas también estaba mediado por receptores β -adrenérgicos, como se ha descrito en células del sistema inmune (31), los queratinocitos fueron tratados con el bloqueante selectivo de receptores β -adrenérgicos, propranolol. Se observó que el antagonista (10^{-5} M) disminuyó significativamente el efecto estimulador de la dopamina sobre la liberación de IL-6 (FIGURA 2C). Como era de esperar, la adición de propranolol (10^{-4} M) no modificó el efecto estimulador de la cabergolina 10^{-4} M (de mínima afinidad por receptores β -adrenérgicos) sobre la producción de IL-6 (FIGURA 2D). En las concentraciones empleadas, el propranolol no modificó los niveles de citoquina liberados al medio de cultivo en ausencia de los agonistas dopaminérgicos.

2. Efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre la producción de IL-8 en células HaCaT

Los niveles de IL-8 aumentaron significativamente en respuesta a la dopamina 10^{-5} y 10^{-4} M, sin

embargo, el incremento logrado fue menor que en el caso de IL-6 y no fue reducido por el ácido ascórbico (FIGURA 3A). Por otro lado, la cabergolina no modificó la producción de IL-8 (FIGURA 3B). Nuevamente, la producción basal de IL-8 en presencia o ausencia de ácido ascórbico fue similar ($69,02 \pm 4,36$ pg/ml y $78,28 \pm 3,66$ pg/ml respectivamente).

La producción de IL-8 inducida por dopamina no se modificó cuando se bloquearon los receptores dopaminérgicos con sulpirida (FIGURA 4A). Sin embargo, el agonista β -adrenérgico propranolol disminuyó significativamente los niveles de la citoquina en el sobrenadante de cultivo (FIGURA 4B).

Discusión

En este trabajo hemos demostrado que los agonistas dopaminérgicos pueden estimular la producción de IL-6 e IL-8 en queratinocitos. El efecto estaría mediado por receptores β -adrenérgicos y dopaminérgicos, y también intervendrían mecanismos oxidativos independientes de receptores.

Es conocido el efecto modulador de las catecolaminas sobre la funcionalidad de diversas células del

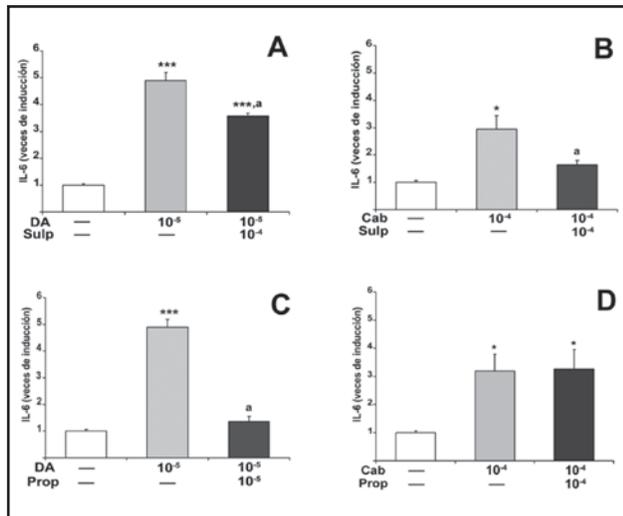


FIGURA 2. Efecto de los antagonistas sulpirida (Sulp, dopaminérgico) y propranolol (Prop, β -adrenérgico) sobre la liberación de IL-6 luego del tratamiento con dopamina (DA, paneles A y C) y cabergolina (cab, paneles B y D). Los valores de citoquinas se expresan como veces de inducción con respecto al control (al que se le asigna el valor de 1) \pm error estándar. * $p < 0,05$ vs. control; ***: $p < 0,001$ vs. control; * $p < 0,05$ vs. control; a: $p < 0,05$ vs. dopamina (A) o cabergolina (C).

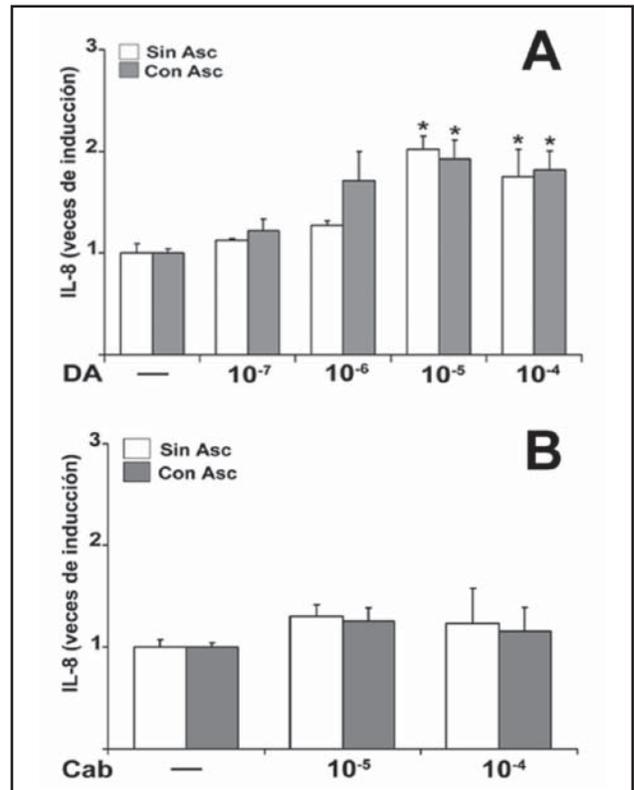


FIGURA 3. Efecto de los agonistas dopaminérgicos dopamina (DA) y cabergolina (cab) sobre la producción de IL-8 en cultivos de células HaCaT, luego de 24 h de cultivo, en ausencia (Sin Asc) y presencia de ácido ascórbico, 0,1 mM (Con Asc). Los valores de citoquinas se expresan como veces de inducción con respecto al control (al que se le asigna el valor de 1) \pm error estándar. * $p < 0,05$ vs control.

sistema inmune (5, 6, 32). Por ejemplo, recientemente se ha demostrado que la epinefrina y la norepinefrina estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) en macrófagos, células clave en el inicio de la respuesta inmune adaptativa, resultando potentes activadores de estos (33). A nivel de la piel, otros autores han demostrado en células de melanoma que norepinefrina induce la producción de IL-6, IL-8 y VEGF, asociándose con la progresión de cáncer (10). Nuestros resultados demuestran que la dopamina estimula la producción de IL-6 e IL-8 en queratinocitos HaCaT y es interesante notar que el efecto sobre la IL-6 es de mayor magnitud que sobre la IL-8 (4-8 veces vs. el doble del basal, respectivamente). En concordancia con nuestros resultados, se ha descrito un efecto estimulador de la dopamina sobre la IL-6 en células adrenales (34) y sobre IL-8 en células endoteliales de pulmón (35).

Por otro lado, es de destacar que el efecto estimulador de la dopamina sobre la producción de IL-6 en los queratinocitos disminuyó notoriamente en presencia del antioxidante ácido ascórbico, acción que no se observó para la IL-8. Es sabido que en estas células, la vitamina C contribuye a contrarrestar el estrés oxidativo (27) disminuyendo, por ejemplo, la producción de IL-6

exacerbada por el estímulo inflamatorio de luz UV (36); si bien altas concentraciones de ácido ascórbico (2,5 M) también redujeron los niveles de IL-8, concentraciones menores similares a la empleada por nosotros tampoco alteraron la producción de la quimioquina inducida por luz UV (37). Este efecto inmunomodulatorio diferencial del ácido ascórbico sobre la producción de citoquinas se evidencia también en otros tipos de células (35, 38, 39).

Considerando los resultados obtenidos, sugerimos que el efecto de DA sobre la producción de IL-6 estaría mediado en parte por mecanismos oxidativos propios de la amina, a diferencia del efecto sobre la expresión de IL-8, en el cual intervendrían preferentemente vías menos sensibles a mecanismos redox. En concordancia con nuestros resultados se ha demostrado en macrófagos que la dopamina es capaz de regular la producción de citoquinas (IL-12p40 e IL-10) mediante mecanismos dependientes e independientes de receptores, estos últimos relacionados con la autooxidación (31). En cuanto a las vías dependientes de receptores, se ha descrito que la dopamina puede modificar la funcionalidad de las células inmunes interactuando con receptores dopaminérgicos y también adrenérgicos (5). Como hemos mencionado al principio, la dopamina puede estimular o inhibir la producción de numerosas citoquinas y, por ende, colaborar o dificultar la respuesta inmune, de acuerdo con el estado de activación de la célula y de los subtipos de receptores con los cuales interactúe; este tema aún es controvertido (5, 40).

Mediante el empleo de antagonistas de los receptores dopaminérgicos de tipo D2 (sulpirida) y de los β -adrenérgicos (propranolol) demostramos que el efecto estimulador de la dopamina sobre la producción de IL-6 e IL-8 involucraría a estos receptores. La sulpirida, antagonista de los receptores D2, disminuyó parcialmente la producción de IL-6 inducida por la dopamina. Este efecto no se debió a una acción tóxica de la droga a alta concentración ya que la viabilidad celular no fue alterada. En concordancia con nuestros resultados, se ha demostrado en células de la glomerulosa adrenal que la dopamina incrementa la liberación de IL-6 a través de receptores dopaminérgicos de tipo D2, además de suprimir la producción de TNF- α (34). Por su parte, Hasko y cols. (31), trabajando en macrófagos, observaron que la dopamina suprime la producción de IL-12 por unión a receptores β -adrenérgicos. Estos autores sugieren un importante rol modulador de la dopamina en la inflamación y en los procesos inmunes. Nosotros demostramos en queratinocitos que el propranolol, antagonista β -adrenérgico, bloqueó el efecto estimulador de la dopamina sobre la producción de IL-6 e IL-8. Estos hallazgos indican que los receptores β -adrenérgicos también estarían implicados en el efecto de la dopamina sobre los queratinocitos.

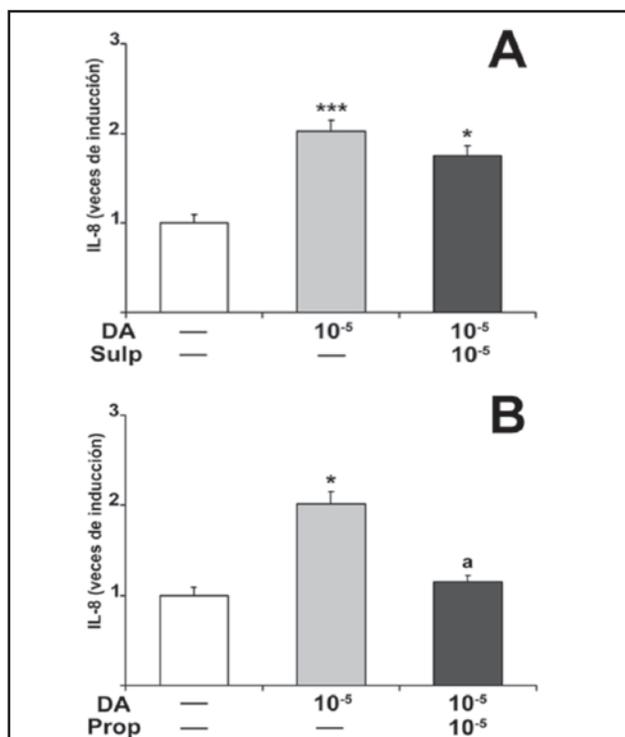


FIGURA 4. Efecto de los antagonistas sulpirida (Sulp, dopaminérgico) y propranolol (Prop, β -adrenérgico) sobre la liberación de IL-8 luego del tratamiento con dopamina (DA, panel A y B respectivamente). Los valores de citoquinas se expresan como veces de inducción con respecto al control (al que se le asigna el valor de 1) \pm error estándar. * $p < 0,05$ vs. control; ***: $p < 0,001$ vs. control; * $p < 0,05$ vs. control; a: $p < 0,05$ vs. dopamina.

Para confirmar estos resultados, empleamos la cabergolina, potente agonista dopaminérgico de tipo D2, utilizado en el tratamiento de la hiperprolactinemia, tumores hipofisarios y en menor proporción en la enfermedad de Parkinson. Este derivado del ergot, de gran afinidad por los receptores dopaminérgicos de tipo D2, incrementó la producción de IL-6 en queratinocitos, efecto que fue revertido por el antagonista sulpirida, lo que indica la participación de los receptores dopaminérgicos. Como era previsible para un compuesto de mínima afinidad por los receptores adrenérgicos, el propranolol no modificó la producción de IL-6 inducida por la cabergolina, lo que señala que estos receptores no estarían implicados en el efecto sobre la citoquina. Hasta el momento, un solo estudio realizado en individuos hiperprolactinérmicos evaluó el efecto de la cabergolina sobre la producción de citoquinas proinflamatorias y no observó cambios en los niveles de IL-6 y TNF- α a nivel sistémico ni en la producción de estas citoquinas en macrófagos aislados de sangre periférica (41). Algunos trabajos sugieren que la cabergolina posee propiedades antioxidantes en el sistema nervioso central, incluso podría actuar sinérgicamente con antioxidantes endógenos como la vitamina E y el ácido ascórbico (42-44). En los queratinocitos la presencia de ácido ascórbico no modificó el efecto de la cabergolina sobre la IL-6. Esta discrepancia podría deberse a la baja concentración de antioxidante utilizado (0,1 mM) y al modelo sobre el cual se estudia el efecto del agonista dopaminérgico. Con relación a la IL-8, la cabergolina no alteró la producción de esta citoquina en los queratinocitos. Este es el primer reporte del efecto de la cabergolina sobre la producción de citoquinas a nivel cutáneo. Si bien nuestros hallazgos fueron realizados en un modelo in vitro (las células HaCaT poseen muchas propiedades "fisiológicas"), nos inducen a pensar que otros agonistas dopaminérgicos, que comenzaron a utilizarse como antiparkinsonianos por vía transdérmica, podrían generar irritación de la piel a través de la inducción de citoquinas proinflamatorias (45).

Se ha demostrado que IL-6 e IL-8 estimulan la proliferación de queratinocitos humanos y su sobreexpresión está relacionada con desórdenes inflamatorios e hiperproliferativos de la piel (16,46,47). Además, tanto los receptores dopaminérgicos como los adrenérgicos están involucrados en procesos de cicatrización de la piel (24-48). In vivo se ha demostrado que la IL-6 facilita la cicatrización de heridas del epitelio corneano (49). Nuestros resultados nos permiten inferir que la dopamina podría estar implicada en la cicatrización de las heridas modulando la producción de IL-6 e IL-8. No obstante, son necesarios estudios in vivo para validar esta hipótesis.

En conjunto, nuestros resultados evidencian un rol modulador de los agonistas dopaminérgicos en la funcionalidad de los queratinocitos, lo que afecta la pro-

ducción de citoquinas proinflamatorias o quimioquinas. La afinidad de los diferentes agonistas por los distintos receptores catecolaminérgicos determinaría en qué medida podrían afectar la síntesis de cada una de las citoquinas. Sería de interés tenerlo presente al momento de seleccionar el agente dopaminérgico para el tratamiento de desórdenes neurológicos y neuroendocrinos.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el aporte de subsidios de la Universidad de Buenos Aires y del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Referencias

1. Pacheco R, Prado CE, Barrientos MJ, Bernales S. Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells. *J Neuroimmunol.* 2009;216(1-2):8-19.
2. Besedovsky HO, Rey AD. Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immun.* 2007;21(1):34-44.
3. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two super-systems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4):595-638.
4. Sarkar C, Basu B, Chakroborty D, Dasgupta PS, Basu S. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain Behav Immun.* 2010;24(4):525-8.
5. Oberbeck R. Catecholamines: physiological immunomodulators during health and illness. *Curr Med Chem.* 2006;13(17):1979-89.
6. Jiang JL, Qiu YH, Peng YP, Wang JJ. Immunoregulatory role of endogenous catecholamines synthesized by immune cells. *Sheng Li Xue Bao.* 2006;58(4):309-17.
7. Beck G, Brinkkoetter P, Hanusch C, Schulte J, van Ackern K, van der Woude FJ, et al. Clinical review: immunomodulatory effects of dopamine in general inflammation. *Crit Care.* 2004;8(6):485-91.
8. Bergmann M, Sautner T. Immunomodulatory effects of vasoactive catecholamines. *Wien Klin Wochenschr.* 2002;114(17-18):752-61.
9. Mouawad R, Benhammouda A, Rixe O, Antoine EC, Borel C, Weil M, et al. Endogenous interleukin 6 levels in patients with metastatic malignant melanoma: correlation with tumor burden. *Clin Cancer Res.* 1996;2(8):1405-9.
10. Yang EV, Kim SJ, Donovan EL, Chen M, Gross AC, Webster Marketon JI, et al. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain Behav Immun.* 2009;23(2):267-75.
11. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2012;122(4):143-59.
12. Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(2):83-9.
13. Ghazizadeh M. Essential role of IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis. *J Nihon Med Sch.* 2007;74(1):11-22.
14. Kayisli UA, Mahutte NG, Arici A. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *Am J Reprod Immunol.* 2002;47(4):213-21.
15. Nakagome K, Matsushita S, Nagata M. Neutrophilic in-

- flammation in severe asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;158 Suppl 1:96-102.
16. Pietrzak AT, Zalewska A, Chodorowska G, Krasowska D, Michalak-Stoma A, Nockowski P, et al. Cytokines and anti-cytokines in psoriasis. *Clin Chim Acta.* 2008;394(1-2):7-21.
 17. Heidenreich R, Rocken M, Ghoreschi K. Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. *Int J Exp Pathol.* 2009;90(3):232-48.
 18. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(10):679-91.
 19. Suter MM, Schulze K, Bergman W, Welle M, Roosje P, Muller EJ. The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet Dermatol.* 2009;20(5-6):515-32.
 20. Grando SA, Pittelkow MR, Schallreuter KU. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol.* 2006;126(9):1948-65.
 21. Brenci S, Rialdi V, Rialdi G. Neuroimmunological Activities of Keratinocytes. *International Electronic Journal on Dermopharmacological Research.* 2001 July(Articles 2001):1-6.
 22. Fuziwara S, Suzuki A, Inoue K, Denda M. Dopamine D2-like receptor agonists accelerate barrier repair and inhibit the epidermal hyperplasia induced by barrier disruption. *J Invest Dermatol.* 2005;125(4):783-9.
 23. Sivamani RK, Lam ST, Isseroff RR. Beta adrenergic receptors in keratinocytes. *Dermatol Clin.* 2007;25(4):643-53.
 24. Shome S, Rana T, Ganguly S, Basu B, Chaki Choudhury S, Sarkar C, et al. Dopamine regulates angiogenesis in normal dermal wound tissues. *PLoS One.* 2011;6(9):e25215.
 25. Sivamani RK, Pullar CE, Manabat-Hidalgo CG, Rocke DM, Carlsen RC, Greenhalgh DG, et al. Stress-mediated increases in systemic and local epinephrine impair skin wound healing: potential new indication for beta blockers. *PLoS Med.* 2009;6(1):e12.
 26. Pullar CE, Manabat-Hidalgo CG, Bolaji RS, Isseroff RR. beta-Adrenergic receptor modulation of wound repair. *Pharmacol Res.* 2008;58(2):158-64.
 27. Catani MV, Savini I, Rossi A, Melino G, Avigliano L. Biological role of vitamin C in keratinocytes. *Nutr Rev.* 2005;63(3):81-90.
 28. Savini I, Dufflot S, Avigliano L. Dehydroascorbic acid uptake in a human keratinocyte cell line (HaCaT) is glutathione-independent. *Biochem J.* 2000;345 Pt 3:665-72.
 29. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988;106(3):761-71.
 30. Yoshizumi M, Nakamura T, Kato M, Ishioka T, Kozawa K, Wakamatsu K, et al. Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. *Cell Biol Int.* 2008;32(11):1405-11.
 31. Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Deitch EA. Dopamine suppresses IL-12 p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages via a beta-adrenoceptor-mediated mechanism. *J Neuroimmunol.* 2002;122(1-2):34-9.
 32. Leposavic G, Pilipovic I, Radojevic K, Pesic V, Perisic M, Kosec D. Catecholamines as immunomodulators: a role for adrenoceptor-mediated mechanisms in fine tuning of T-cell development. *Auton Neurosci.* 2008;144(1-2):1-12.
 33. Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Sarma JV, Day DE, Lentsch AB, et al. Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. *PLoS One.* 2009;4(2):e4414.
 34. Ritchie PK, Ashby M, Knight HH, Judd AM. Dopamine increases interleukin 6 release and inhibits tumor necrosis factor release from rat adrenal zona glomerulosa cells in vitro. *Eur J Endocrinol.* 1996;134(5):610-6.
 35. Beck GC, Oberacker R, Kapper S, von Zabern D, Schulte J, van Ackern K, et al. Modulation of chemokine production in lung microvascular endothelial cells by dopamine is mediated via an oxidative mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25(5):636-43.
 36. Tebbe B, Wu S, Geilen CC, Eberle J, Kodelja V, Orfanos CE. L-ascorbic acid inhibits UVA-induced lipid peroxidation and secretion of IL-1alpha and IL-6 in cultured human keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol.* 1997;108(3):302-6.
 37. Kang JS, Kim HN, Jung da J, Kim JE, Mun GH, Kim YS, et al. Regulation of UVB-induced IL-8 and MCP-1 production in skin keratinocytes by increasing vitamin C uptake via the redistribution of SVCT-1 from the cytosol to the membrane. *J Invest Dermatol.* 2007;127(3):698-706.
 38. Hartel C, Strunk T, Bucszy P, Schultz C. Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes. *Cytokine.* 2004; 27(4-5):101-6.
 39. Hartel C, Puzik A, Gopel W, Temming P, Bucszy P, Schultz C. Immunomodulatory effect of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in neonatal cord blood cells. *Neonatology.* 2007;91(1):54-60.
 40. Basu S, Dasgupta PS. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J Neuroimmunol.* 2000;102(2):113-24.
 41. Serri O, Li L, Mamputu JC, Beauchamp MC, Maingrette F, Renier G. The influences of hyperprolactinemia and obesity on cardiovascular risk markers: effects of cabergoline therapy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;64(4):366-70.
 42. Lombardi G, Varsaldi F, Miglio G, Papini MG, Battaglia A, Canonico PL. Cabergoline prevents necrotic neuronal death in an in vitro model of oxidative stress. *Eur J Pharmacol.* 2002;457(2-3):95-8.
 43. Yoshida T, Tanaka M, Suzuki Y, Sohmiya M, Okamoto K. Antioxidant properties of cabergoline: inhibition of brain auto-oxidation and superoxide anion production of microglial cells in rats. *Neurosci Lett.* 2002;330(1):1-4.
 44. Sohmiya M, Tanaka M, Okamoto K, Fujisawa A, Yamamoto Y. Synergistic inhibition of lipid peroxidation by vitamin E and a dopamine agonist, cabergoline. *Neurol Res.* 2004;26(4):418-21.
 45. Reichmann H. Transdermal delivery of dopamine receptor agonists. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009; 15 Suppl 4:S93-6.
 46. Hernandez-Quintero M, Kuri-Harcuch W, Gonzalez Robles A, Castro-Munozledo F. Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture. *Cell Tissue Res.* 2006; 325(1):77-90.
 47. Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, et al. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(16):6367-71.
 48. Pullar CE, Grahn JC, Liu W, Isseroff RR. Beta2-adrenergic receptor activation delays wound healing. *FASEB J.* 2006;20(1):76-86.
 49. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T, Hikida M. Interleukin 6 facilitates corneal epithelial wound closure in vivo. *Arch Ophthalmol.* 1992;110(9):1292-4.