

Tesis de Posgrado

El sistema complemento en la fiebre hemorrágica argentina

Rimoldi, María Teresa

1978

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rimoldi, María Teresa. (1978). El sistema complemento en la fiebre hemorrágica argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1610_Rimoldi.pdf

Cita tipo Chicago:

Rimoldi, María Teresa. "El sistema complemento en la fiebre hemorrágica argentina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1978. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1610_Rimoldi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD de BUENOS AIRES

FACULTAD de CIENCIAS EXACTAS y NATURALES

TESIS de DOCTORADO REALIZADA en :

Sección Inmunológica, Instituto de Microbiología y
Parasitología

y

Sección Inmunología, Instituto de Investigaciones
Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de
Buenos Aires

EL SISTEMA COMPLEMENTO EN LA
FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA.

AUTOR : Licenciada María Teresa Rimoldi

DIRECTOR : Dra María Marta de Elizalde de Bracco

Consejero de estudios : Dr Jorge M Affanni

1 0 0 3

2

A mi padre

INDICE

CAPITULO I	Introducción y plan de trabajo.....	1
CAPITULO II	El sistema complemento.....	5
CAPITULO III	Fiebre hemorrágica Argentina.....	18
CAPITULO IV	Material y métodos.....	30
CAPITULO V	Alteraciones del sistema complemento en la fiebre hemorrágica argentina experimental del cobayo.....	53
CAPITULO VI	Ineficiencia hemolítica del componente C ₄ del suero de cobayos infectados experimentalmente con virus Junín.....	59
CAPITULO VII	Mecanismos de activación del sistema complemento en la FHA experimental del cobayo.....	64
CAPITULO VIII	Alteraciones del sistema complemento y la respuesta humoral antiviral Junín en la FHA (enfermedad humana).....	77
CAPITULO IX	Discusión y conclusiones.....	92
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....		99
Firmas de autor y director.....		105

CAPITULO I

Introducción y plan de trabajo

Con este trabajo se presentan datos que contribuyen al mejor conocimiento de la enfermedad denominada Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) que se presenta anualmente y en forma endemoepidémica en el Noroeste de la Provincia de Buenos Aires y zonas adyacentes.

La enfermedad experimental en cobayo fué ampliamente estudiada en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina donde se realizó parte de esta tesis, por distintos grupos de investigadores bajo la dirección de los Dres. Armando Parodi y Marcelo J. Frigerio.

Ha sido discutido el papel del sistema complemento (C) y de sus productos de activación, ^{en} la patología de fiebres hemorrágicas inducidas por virus que no pertenecen al grupo arenavirus. En el dengue asiático, por ejemplo, se postuló que los factores que determinan la producción de shock son los productos de activación de C3 y C5 (anafilotoxinas derivadas de C.). La acción de un agente desencadenante de la reacción de activación de C (complejos inmunes virus-antivirus) lleva a la producción de fragmentos de bajo peso molecular de potente actividad biológica capaces de liberar histamina y alterar la permeabilidad vascular (C3a, C5a). Los fragmentos de tamaño mayor tienen la función de con-

tinuar la reacción en cadena, que culmina con la lisis de membranas celulares.

Si bien dentro de los primeros estudios del sistema C, los fenómenos de lisis recibieron la mayor atención recientemente se conoce que en los mecanismos de defensa otras funciones del sistema C son igualmente importantes (promoción de la fagocitosis, inmunoadherencia, quimiotaxis, etc), sin llegar al paso final de la lisis. Finalmente, en los últimos años han sido estudiados otras importantes funciones biológicas de significación fisiológica aún no completamente exploradas, tales como la activación de los macrófagos a través de C3b, la agregación plaquetaria C dependiente, la movilización de los leucocitos de la médula al torrente sanguíneo, la regulación de la actividad de los linfocitos, la interrelación con el sistema kalikreina-kininas, etc.

Estos mecanismos pueden ser beneficiosos para el huésped pero también pueden influir en la gravedad de la enfermedad, ya sea por su colaboración en la producción de shock o a través de la destrucción celular directa o mediada por macrófagos activados.

Una de las particularidades del sistema C es la interrelación de su activación con la de los otros sistemas enzimáticos-plasmáticos de reacción en cascada; coagulación, kalikreina-kininas, fibrinólisis.

La frecuencia de las manifestaciones hemorrágicas que ocurren en el cobayo experimentalmente infectado con virus Junín llevó a la Dra. Budzko y colaboradores a interesarse en la posibilidad de que el C jugara algún papel en la patogenia de la FHA experimental. Así los primeros estudios de Budzko y colaboradores (26) demostraron que existía un descenso de la actividad hemolítica total de C sérico con aparición de productos de degradación de C3 en los cobayos infectados con virus Junín luego del 8º día de infección y persistía hasta la muerte de los animales. A partir de esa observación se diagramó el plan de trabajo de esta tesis. Por lo tanto el proyecto estuvo dirigido inicialmente al estudio del mecanismo de activación del sistema C en el cobayo experimentalmente infectado con el virus Junín. Los datos obtenidos condujeron luego a nuevas observaciones sobre características de acción de algunos componentes y la interrelación con los otros sistemas como es el de coa-

gulación (en colaboración de la Dra, Felisa Molinas). En los mismos animales de experimentación se realizaron estudios anatomopatológicos (en colaboración con el Dr. R. Paz). Posteriormente gracias a la colaboración del Dr. Maiztegui se logró extender el estudio a pacientes con FHA siendo esto pionero en las enfermedades producidas por virus del grupo arenavirus.

En el Instituto de Investigaciones Médicas donde se terminó esta tesis existe una amplia experiencia en trabajos sobre el estudio del sistema C en las distintas patogenias bajo la dirección de los Drs. Delmaso, J. Manni y la Dra. M. M. de Elizalde de Bracco.

Para facilitar la presentación y discusión del trabajo experimental se consideró conveniente realizar una revisión de los conceptos más importantes sobre el mecanismo de reacción del sistema C y una descripción de la enfermedad a estudiar.

Los distintos capítulos constituyen además de la descripción de los materiales y métodos utilizados en la ejecución de este trabajo, la presentación de los resultados obtenidos y la discusión de los mismos en función de su posible significación biológica.

CAPITULO II

El sistema complemento

'9

Figuras y lineamientos generales segun

H. J. Müller-Eberhard

**Chemistry and function of the
complement system.**

Hospital Practice (1977)

..

El mecanismo de reacción del sistema Complemento (C) ha adquirido en los últimos años gran significación biomédica. Su estudio abarca temas tan diversos como la investigación de las características moleculares de la citólisis inmune, hasta las deficiencias de C o inmunopatología humana y experimental.

El sistema C no solamente está vinculado a fenómenos de destrucción celular o tisular, sino que también mediante la colaboración con inmunoglobulinas y células, condiciona mecanismos de defensa y preservación del organismo.

Desde el siglo pasado se conoce la existencia en el suero de proteínas que con características de termo-estabilidad o por el contrario termo-lábiles, median o "complementan" la lisis celular o bacteriana en presencia de una respuesta inmune específica. La activación de estas proteínas provoca no solamente lisis de membranas sino también la generación de fragmentos protéicos con potente actividad biológica que agrega un proceso inflamatorio a las consecuencias de la misma.

Aparentemente algunas funciones del sistema son tan importantes para la conservación de los organismos, que a lo largo de la evolu-

ción, parecen haber surgido diversos mecanismos capaces de operar en forma independiente pero que convergen hacia un mismo resultado final: la lisis o alteración de algunas membranas celulares.

Así, hoy se conoce que el sistema C puede ser activado de dos maneras diferentes que operan con vías de inducción disímiles pero que se fusionan en el efecto final, una es la vía llamada "clásica" y la otra "alternativa". En 1954 Louis Pillemer postuló la existencia de un sistema de proteínas que son activas en las defensas iniciales del hospedador contra bacterias y virus. Actualmente se sabe que una de estas proteínas, la properdina, es un componente de la vía alternativa. La vía clásica del C actúa cuando las células susceptibles reaccionan con anticuerpos fijadores de C que inician esa ruta. Por el contrario la vía de la properdina o alternativa se pone en marcha cuando existen en las células estructuras de membrana que en ausencia de anticuerpo activan una enzima iniciadora. Ciertas clases de anticuerpos que no fijan C pero que se unen a células infectadas en condiciones especiales también pueden activar la vía alternativa. En forma notable, la IgE que es responsable de inducir un sistema lítico liberando mediadores intracelulares,

no activa el C por ninguna de las vías.

Examinando el sistema C puede verse que las proteínas que lo componen, al ser activadas por la reacción antígeno-anticuerpo reaccionan de manera característica formando complejos multimoleculares sobre la superficie de las membranas biológicas.

Como consecuencia de estas reacciones, la superficie, estructura y función de las biomembranas se alteran profundamente. La acción de los componentes terminales puede provocar la muerte celular, pero en los diferentes pasos previos de la reacción se pueden activar algunas funciones específicas como por ejemplo la liberación de histamina de las células cebadas y plaquetas, quimiotaxis de leucocitos, promoción de fagocitosis, contracción del músculo liso y agregación plaquetaria. La mayor parte de las actividades no citolíticas del C son obra de productos de fisión o de agregación de sus componentes.

En resumen, las manifestaciones biológicas del C comprenden: la destrucción celular, inflamación, promoción de la coagulación y quizás la activación de las células linfoides de tipo B.

VIA CLÁSICA DE ACTIVACIÓN DE C:

La señal que provoca la activación del primer componente es un cambio en el Fc de algunas inmunoglobulinas (IgG_1 ; IgG_2 ; IgG_3 ; IgM) inducido por la reacción antígeno-anticuerpo o por simple agregación de las inmunoglobulinas por métodos físicos o químicos. Así pues, el primer componente de C:Cl, que a su vez está compuesto por tres subunidades (Clq, Clr, Cls) unidos por el ion Ca^{++} adquiere actividad esterásica, siendo sus substratos naturales dos proteínas que siguen en la secuencia de C: C_4 y C_2 . (Fig 1)

Como modelo para el estudio de la reacción de activación del C se ha utilizado comunmente el sistema hemolítico compuesto por eritrocitos ovinos (E), anticuerpo antieritrocitos de ovino (A). Sobre la membrana de los eritrocitos sensibilizados (EA) es posible construir complejos intermediarios agregando en forma sucesiva componentes del sistema en diluciones límites o purificados.

El primer componente activado, \overline{Cl} , actúa sobre C_4 generando dos fragmentos, C_{4b} y C_{4a} . La movilidad electroforética de C_4 es modificada al producirse esta reacción, aumentando su velocidad de migración. C_{4b} , el fragmento de mayor peso molecular se combina con la membrana de

de la célula originando un "sitio" $C4$. Si no se combina con el receptor en la membrana permanece en solución como un subproducto inactivo hemolíticamente.

$C2$ es el siguiente componente en la secuencia de reacción. Su combinación con $C4b$ requiere la acción previa de $C1$ y la presencia de Mg^{++} . $\overline{C1}$ cliva a $C2$ en dos partes: uno de mayor tamaño, $C2a$ que es el que se combina con $C4$ y un componente de tamaño menor.

La reacción de $C4$ con $C2$ tiene como resultado la formación de una enzima: $\overline{C42}$, llamada $C3$ convertasa. Esta es de carácter inestable pues $C2$ "decae" y se disocia en forma inactiva de manera espontánea.

El substrato de $C3$ convertasa es $C3$, el cual también sufre una reacción de clivaje de la que se originan dos fragmentos, $C3b$ y $C3a$. Si $C3b$, el de tamaño mayor, no se combina con un receptor apropiado de la membrana celular o con la inmunoglobulina permanece inactivo en solución, pero parece tener importantes funciones para la activación de la vía alternativa y la regulación de la síntesis de $C3$ nativo. $C3a$, el fragmento de menor peso es un péptido básico de gran actividad biológica, siendo una de las anafilotoxinas derivadas del C .

El componente enzimático generado ($\overline{C423}$), reacciona con C5, C6 y C7, pero la incorporación de C5 es mayor en presencia de C6 y el complejo EAC1-7 adquiere estabilidad.

C5 es a su vez fragmentado por la acción de $\overline{C423}$ en C5b y C5a en forma análoga a C3. Transitoriamente el C5b puede combinarse con la membrana celular o permanecer en solución. C5 activado puede formar un complejo con C6: $\overline{C56}$, el cual en presencia de C7 aumenta su afinidad por superficies lipofílicas y de esta manera los tres componentes en forma de un complejo $\overline{C567}$ pueden transitoriamente unirse a la superficie celular aún en ausencia de anticuerpo. C5a es un fragmento de potente actividad anafilotóxica diferente de C3a y posee además actividad quimiotáctica. A su vez el complejo $\overline{C567}$ es también quimiotáctico para leucocitos polimorfonucleares.

Finalmente C8 reacciona con la membrana celular produciendo un daño funcional que es amplificado y potenciado por C9.

Como consecuencia de la reacción de C8 y C9 con la membrana celular hay un cambio en la permeabilidad de la membrana y debido al desequilibrio osmótico producido sobreviene la lisis. En estos últimos pa-

...s la composición catiónica del medio intra y extra celular es un factor de importancia que regula el grado final de lisis obtenido.

En resumen, la reacción de activación de C hemolítico por la vía clásica ocurre en varias etapas que son esquematizadas en las figuras 2 y 3.

Si bien la activación de todos los componentes es necesaria para producir la lisis de la membrana celular, los productos de degradación y complejos intermedios obtenidos a lo largo de la cadena de la reacción son suficientes para provocar importantes reacciones biológicas tales como la opsonización de bacterias que favorece su fagocitosis, la adherencia inmune, la lisis celular mediada por linfocitos, quimiotaxis, etc.

Muchos de estos efectos son logrados no sólo con la activación de la vía clásica sino también, y a veces de manera preferencial cuando ocurre la activación de C por la vía alternativa.

VÍA ALTERNATIVA DE ACTIVACION DE C:

Desde hace muchos años se conocía el efecto inactivador de C de ciertos venenos de serpientes, de las endotoxinas bacterianas y de polisacáridos derivados de la pared de levaduras.

Estas substancias son capaces de alterar la actividad hemolítica del C sin consumir aparentemente los componentes iniciales. Últimamente esta modalidad en la activación de los componentes terminales, llamada vía alternativa o vía de la properdina ha sido objeto de intensa investigación. Se ha reconocido la participación de la properdina y de un sistema enzimático capaz de reaccionar con una proteína presente en el suero humano normal, el proactivador de C3 (C3PA) o factor B, que es activado a activador de C3, un complejo enzimático con actividad similar a la de C3 convertasa de la vía clásica, capaz de producir la conversión de C3 (fig. 4). Este complejo está formado por el factor \bar{B} activado por la acción de factor \bar{D} , Mg^{++} y C3b.

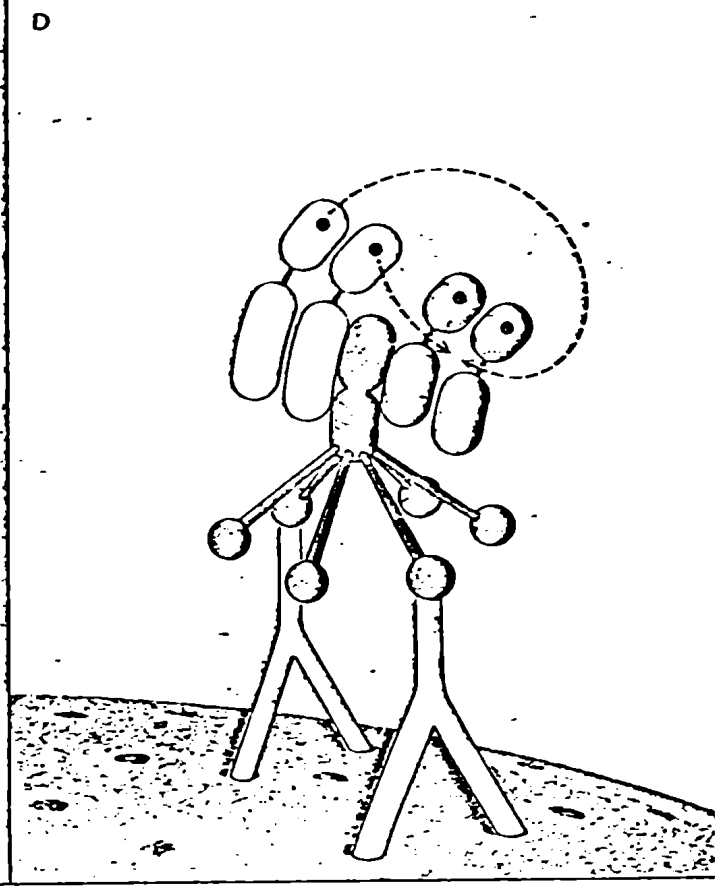
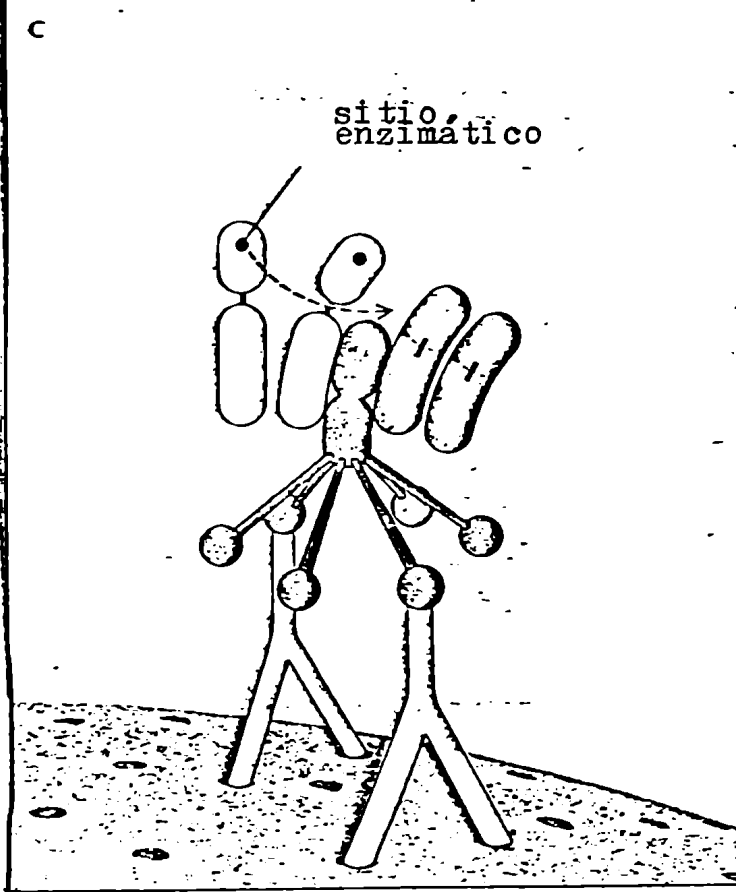
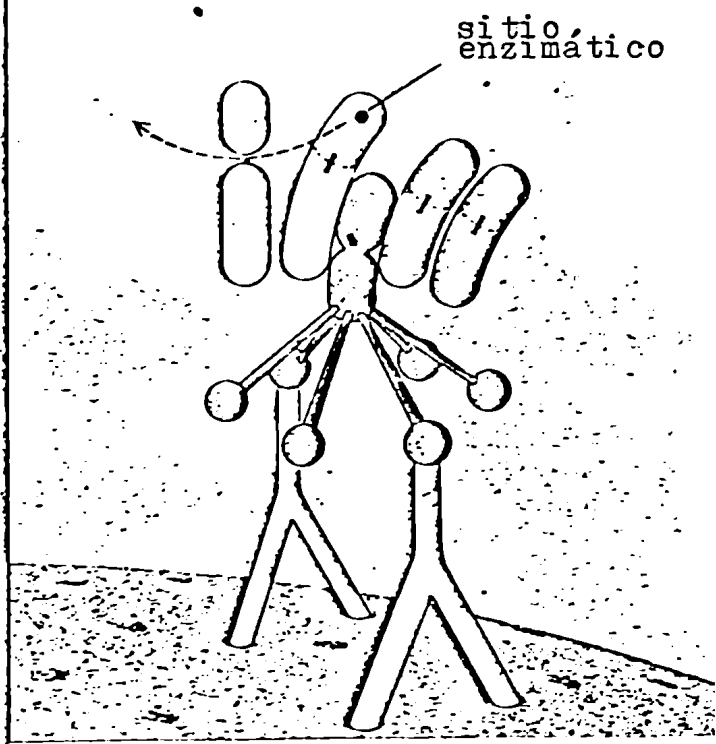
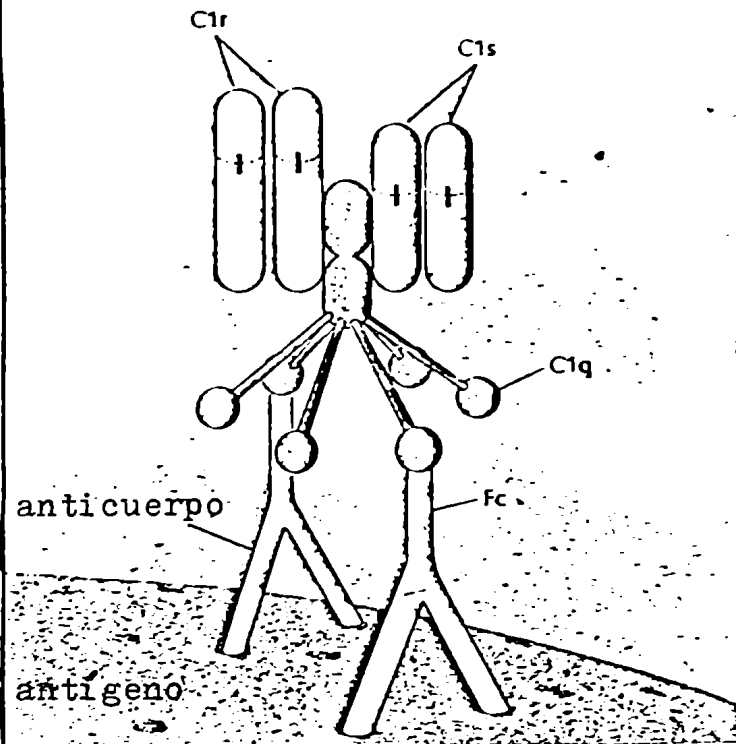
El fragmento C3b tiene importancia por un mecanismo de "feed back" ya que integra la C3 convertasa de la vía alterna y de esta manera, cada vez que se produce C3b como resultado de la activación de C por la vía clásica se amplifica el clivaje de C3.

De esta manera para saber si el mecanismo alternativo de activación fue puesto en juego por un estímulo determinado sin la participación de la vía clásica es necesario trabajar en condiciones en que ésta

esté bloqueada (por ejemplo en ausencia del ion Ca^{++}) o con sueros deficientes en los componentes iniciales.

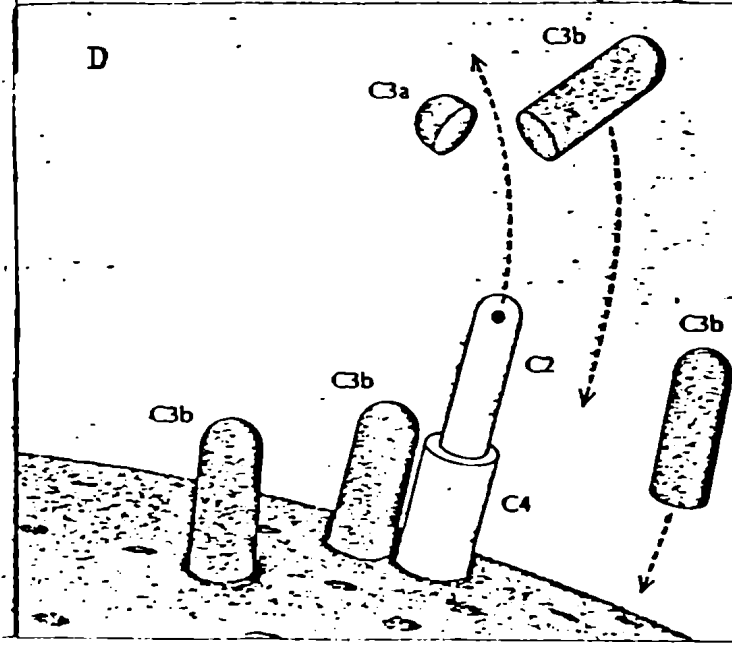
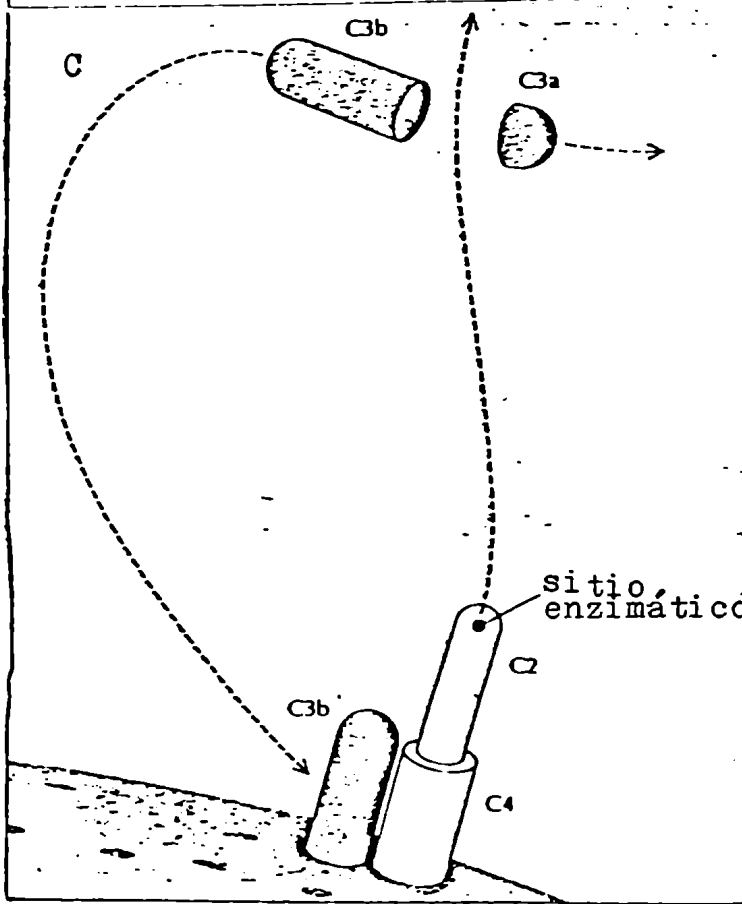
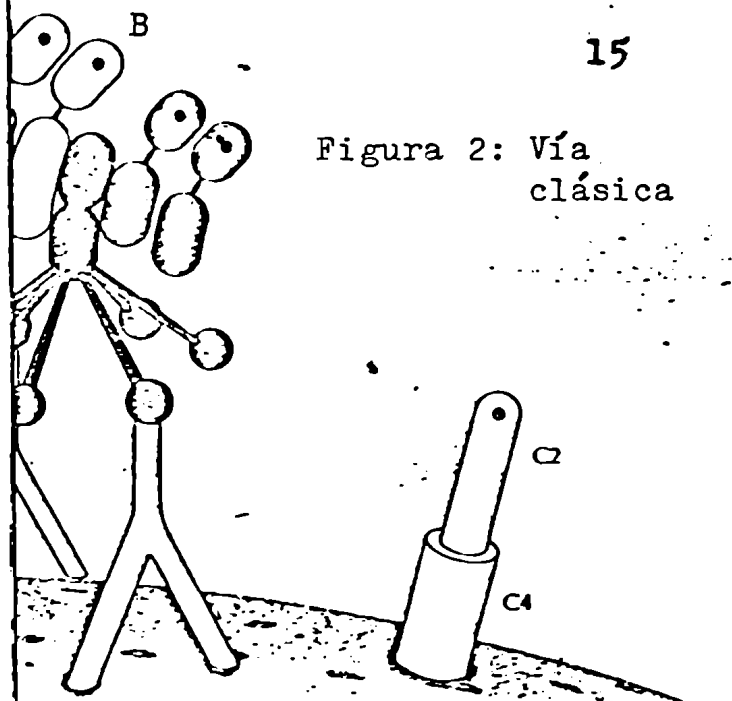
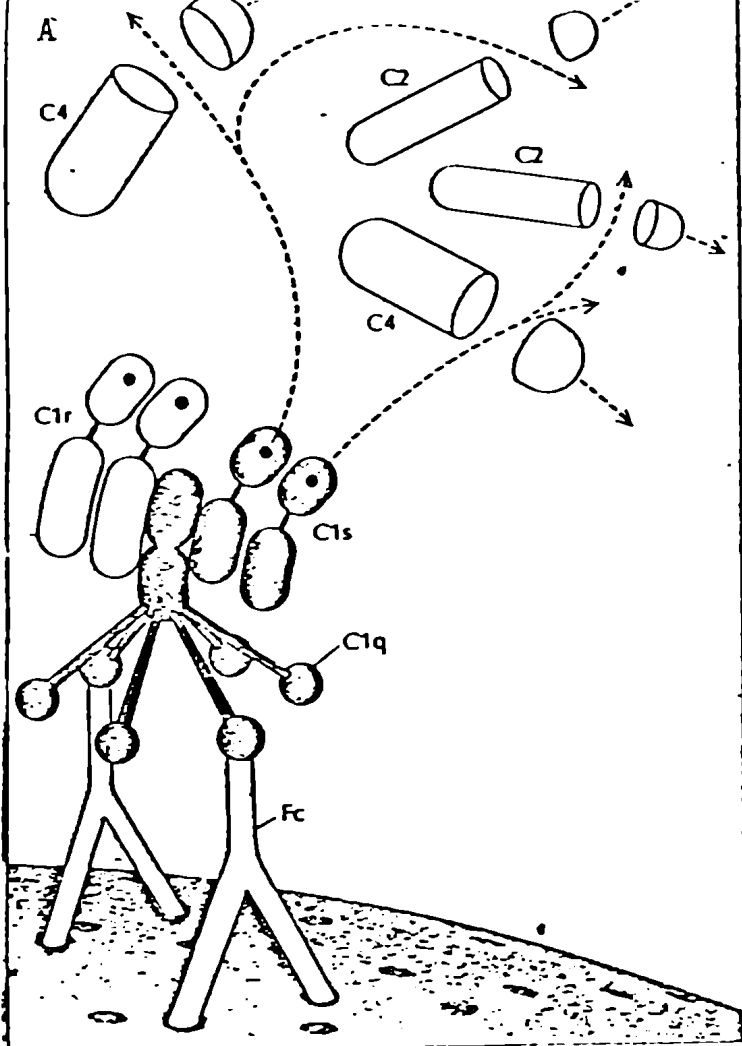
La reacción de activación del C hemolítico por la vía alternativa está esquematizada en la figura 4.

Figura 1: vía clásica, 14
activación de C1.



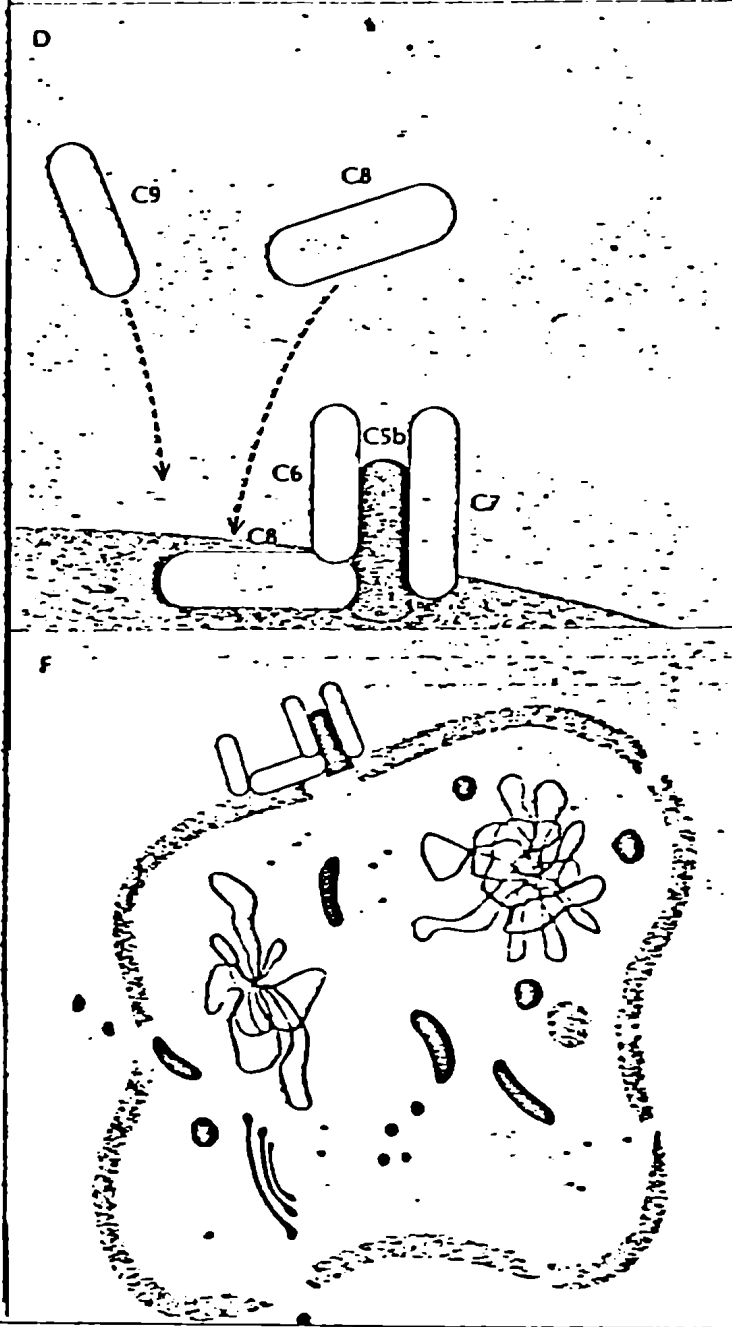
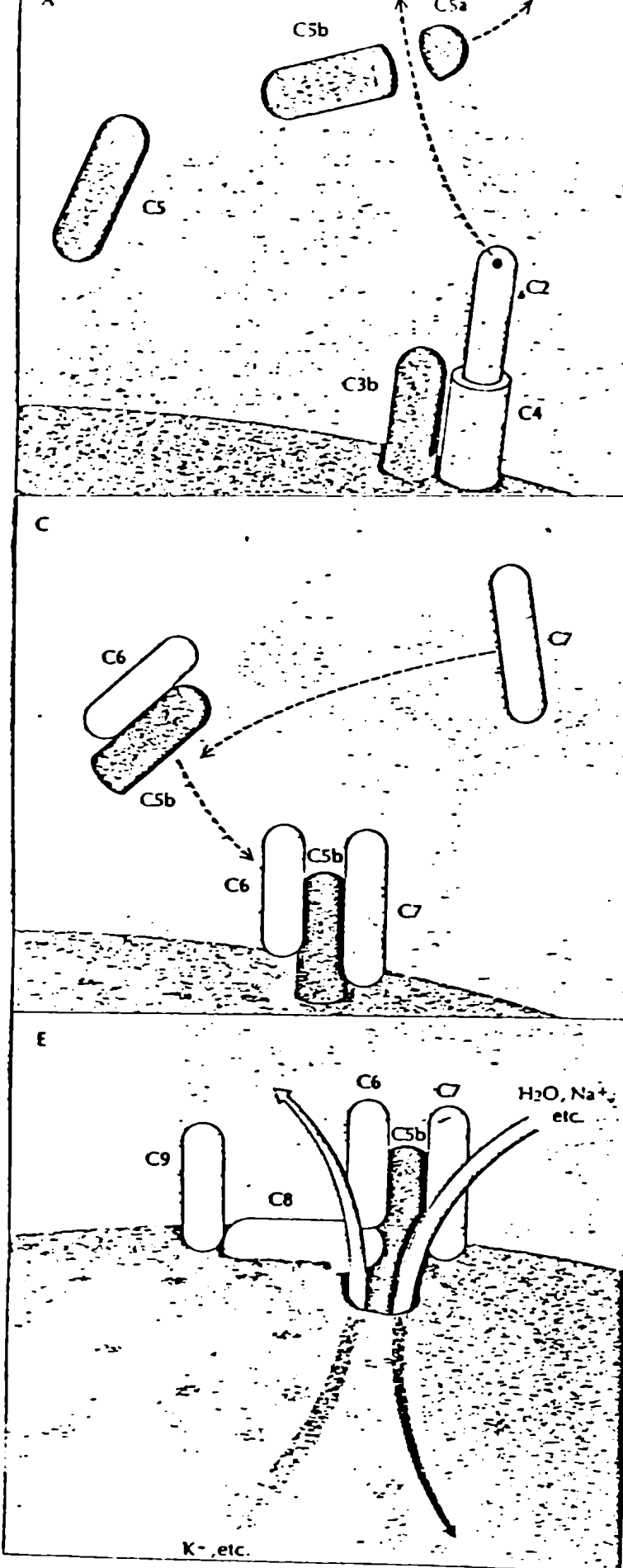
La unidad de reconocimiento y su activación: La activación de C se inicia con la unión del complejo trimolecular C1 al anticuerpo unido al antígeno(A). Se ha postulado que un cambio en la configuración de C1q distorsiona una de las cadenas polipeptídicas de C1r, exponiendo un sitio enzimático que a su vez cliva la segunda cadena(B). Esto produce la apertura de un nuevo sitio enzimático que cliva al polipeptido previamente distorsionado(C). El fragmento de C1r activado a su vez cliva las cadenas de C1s generando 2 fragmentos activos(D).

Figura 2: Vía clásica



novalentes sobre la superficie de la célula blanco(D). Estos sitios C3b actúan como receptores para inmunoadherencia de muchas células efectoras (monocitos, polimorfonucleares, macrófagos).

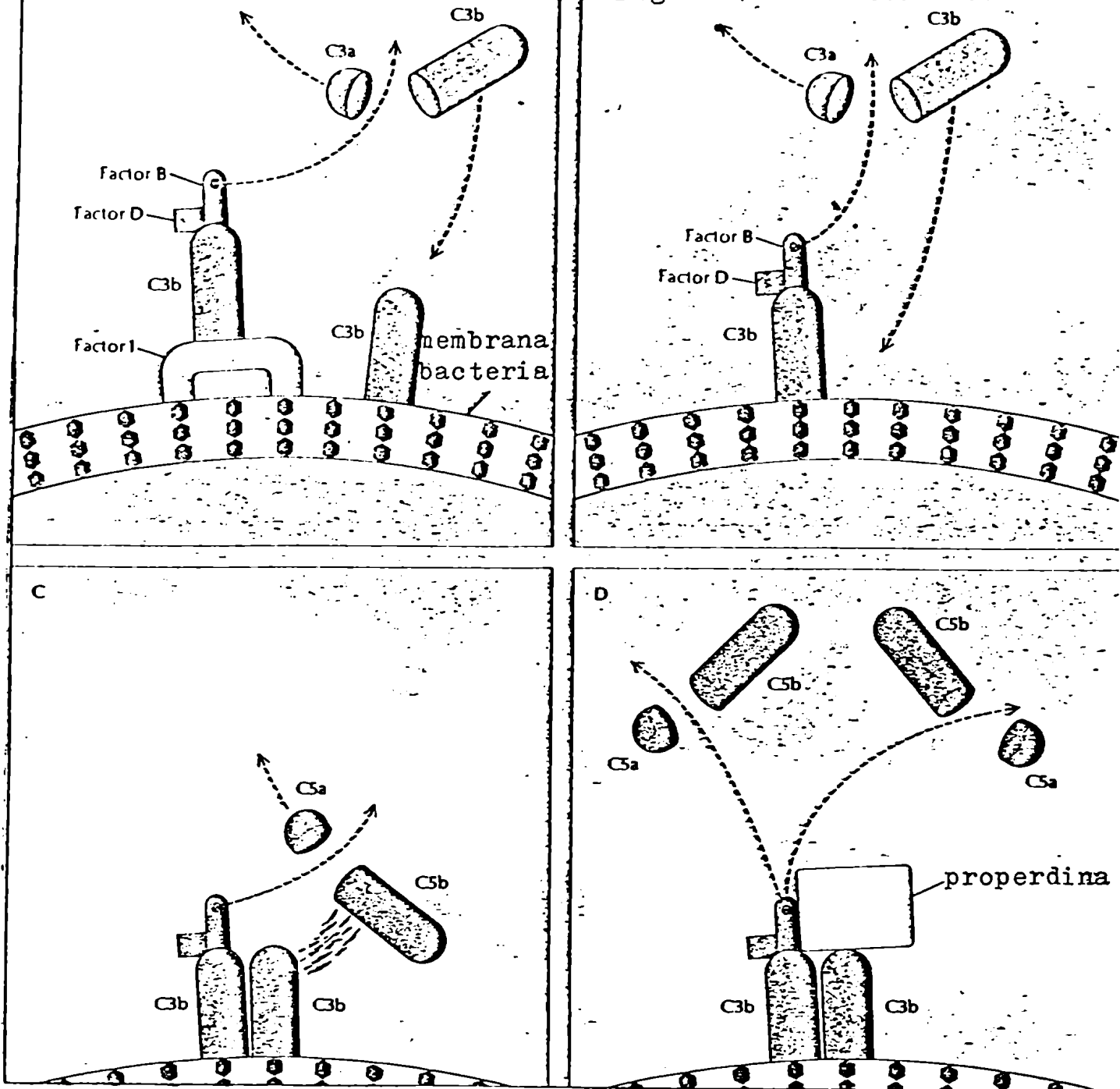
C1s activado ataca a C4 y C2 en este orden, perdiendo cada uno un péptido pequeño en esta activación (A). Como consecuencia de la acción de C1 sobre C4, queda expuesto sobre este componente un sitio reactivo que sirve para que C4b se combine con la membrana(B). C4b actúa enzimáticamente sobre C3, liberando la anafilotoxina C3a que interviene en los procesos inflamatorios. C3b tiene un rol dual, por un lado forma el complejo trimolecular con C4b(C) y por otro genera sitios mo-



C423b es una C5 convertasa que rompe C5 liberando una segunda anafilotoxina C5a(A). C5b sirve como punto focal para el complejo atacante de la membrana junto con C6 y C7(B y C).

Luego se unen C8 y C9(D) y se cree que la acción de C8 es abrir las puertas de los canales que atraviesan la membrana(E) que son hidrofílicos. La célula se hincha al entrar H₂O y Na⁺ y se rompe la membrana celular(E y F). Con la salida de macromoléculas la lisis celular es completa.

Figura 4: Vía alternativa



Cuando el anticuerpo no juega un rol en la iniciación de la vía de la properdina o alterna, su reemplazante es el factor de iniciación (Factor I), una proteína capaz de reconocimiento y unión a carbohidratos de las superficies de bacterias o virus. El Factor I interacciona con C3, Factor B y D para formar la C3 convertasa inicial que cliva C3 del suero. C3b es transferido a la superficie celular (A). Con Factor B y D, C3b forma una segunda C3 convertasa, unida a la superficie celular (B). Se producen clivajes enzimáticos de otras moléculas de C3, y se genera un nuevo complejo polimoléculas con dos o más moléculas de C3b. Esto es la C5 convertasa (C), que es lábil hasta que la unión con la properdina la estabiliza (D). A partir de este momento ambas vías, la clásica y la alternativa, son idénticas.

CAPITULO III

Fiebre Hemorrágica Argentina

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) es una enfermedad viral aguda caracterizada por compromiso renal, cardiovascular y hematológico. En los últimos 16 años afectó a 16.000 personas en Argentina con una mortalidad anual de 10 a 15%. Han sido comunicados casos desde 1943 (1) pero la entidad recién fue descrita por Arribalzaga en 1955 (2). El área endemoepidémica está detallada en la figura 5. En los últimos 20 años la región afectada aumentó 5 veces y en el presente más de un millón de personas por año tienen alto riesgo de exposición al virus. El hecho de que en el área habite cerca del 50% de la población de Argentina aumenta la importancia de la misma.

En 1958 Parodi aisla un agente infeccioso (3) de la sangre de pacientes que es patógeno para cobayos y para ratones lactantes. Al virus se lo denominó Junín por ser esta la ciudad donde el paciente estaba hospitalizado.

El virus Junín está antigénicamente relacionado con Tacaribe y Machupo (agente de la Fiebre Hemorrágica Boliviana) y relacionado morfológicamente con LCM (linfocoriomeningitis). Por estas relaciones se lo clasificó dentro del grupo de los Arenavirus (4). Los virus que componen

este grupo están detallados en el cuadro.1.

El verdadero mecanismo de la transmisión viral no se conoce pero el roedor Calomys musculinus está persistentemente infectado y el pico de incidencia de la epidemia (durante el mes de mayo) coincide con el máximo de densidad de población de los roedores (5).

En el hombre la enfermedad varía en severidad, la mayoría de los casos se recuperan sin secuela pero en algunos pacientes tiene un curso fatal. El período de incubación es de 7 a 16 días. Esto es seguido por la aparición del síndrome viral con fiebre, temblores, dolores de cabeza y musculares, debilidad, anorexia, náuseas y vómitos. Luego de 3 a 5 días en los casos severos puede aparecer deshidratación, oliguria, hipotensión y hemorragias de las encías y cavidades nasales. Los síntomas neurológicos progresan desde desorientación y delirio hasta convulsiones y coma. Entre los días 4 y 9 la mayoría de los pacientes muestra leucopenia, trombocitopenia, proteinuria y elevación de nitrógeno uréico en sangre. Ocasionalmente se ha descrito coagulación intravascular diseminada. El estudio de la hemostasia demuestra que los pacientes presentan prolongación del PTTK en la fase aguda, si bien esta alteración

no parece explicarse por el descenso de los niveles de los factores VIII, IX y XI. En la fase inicial los valores de fibrinógeno se mantienen normales y no se demostró la presencia de monómeros. (cuadro 2)

En general los resultados de estos estudios muestran que las alteraciones de la primera fase de la coagulación observadas no parecen guardar una relación con la gravedad de la enfermedad (6). Se observó una alteración del sistema complemento caracterizada por el aumento de C4 y disminución de C3. (7,8,9,10,11).

Se observó elevación de los niveles de enzimas transaminasas, dehidrogenasa láctica y creatinin fosfoquinasa (CPK). El tratamiento es sintomático. El suero de convalescientes administrado precozmente parece ser efectivo (5).

En los pacientes que sobreviven, la respuesta inmune antiviral Junín es detectable al iniciarse la convalecencia temprana (10) y la posible participación de complejos inmunes solubles en la patogenia inicial queda descartada (8).

En las necropsias se observan linfadenopatías y hemorragias focales en las mucosas gástricas, e intestinales. La presencia de con-

gestiones y edema de los tejidos también es común. Histológicamente sólo hay pocas lesiones que puedan atribuirse al daño viral. Pequeñas hemorragias locales en varios tejidos, muchos cuerpos de inclusión que recuerdan a los cuerpos de Councilman en las células del hígado (PAS+ y hierro -) y pocas necrosis focales. Los ganglios linfáticos, bazo y médula ósea muestran una necrosis linfoidea aguda, hiperplasia de células reticulares y eritrofagocitosis (12). Se pueden apreciar cambios asociados a shock terminal y también evidencia frecuente de infección bacteriana secundaria. La patogenia del daño renal es desconocida. Estudios de microscopía electrónica e inmunofluorescencia revelan un daño severo en los túbulos distal y colector del riñón, sin alteraciones significativas en los glomérulos y los túbulos proximales (13,14, y 15).

Una vacuna experimental clonando la cepa prototipo del virus en células MA 111 (5) fue obtenida y probada en voluntarios humanos.

Como una posible solución para la reducción del tamaño de las epidemias fue propuesto el control de la población de roedores. (5).

El virus Junín es patógeno para cobayos, ratones lactantes y pequeños hamsters (16). Los cobayos fueron seleccionados para estudios

patológicos pues reproducen la enfermedad humana en forma bastante similar aunque con manifestaciones hemorrágicas más exageradas.

Los animales se infectan por cualquier ruta mostrando menor sensibilidad por vía oral. Los signos de la enfermedad son fiebre, pérdida de peso y muerte entre el día 11 y 15 postinfección (PI) (17). Las autopsias revelan petequias, grandes hemorragias en los tejidos subcutáneos, ganglios linfáticos, glándulas adrenales y pared intestinal. En el período final de la enfermedad se ven cambios degenerativos en las células de la sangre periférica. La médula ósea muestra descenso del número de megacariocitos y relativo aumento de las células eritroides (18).

De los estudios con microscopía electrónica parece que el daño de las células sanguíneas empieza en la médula a partir del 5º día antes de que éstas sean evidentes en sangre periférica (19). Al día 9º PI los canales de los megacariocitos contienen partículas pleomórficas de diámetro 80-100 nm (19). Estos hallazgos sugieren una relación entre la trombocitopenia observada y la infección (21).

La viremia es persistente con virus localizado en ganglios linfáticos y bazo; se encuentra virus en orina pero no en materiales fecales (20).

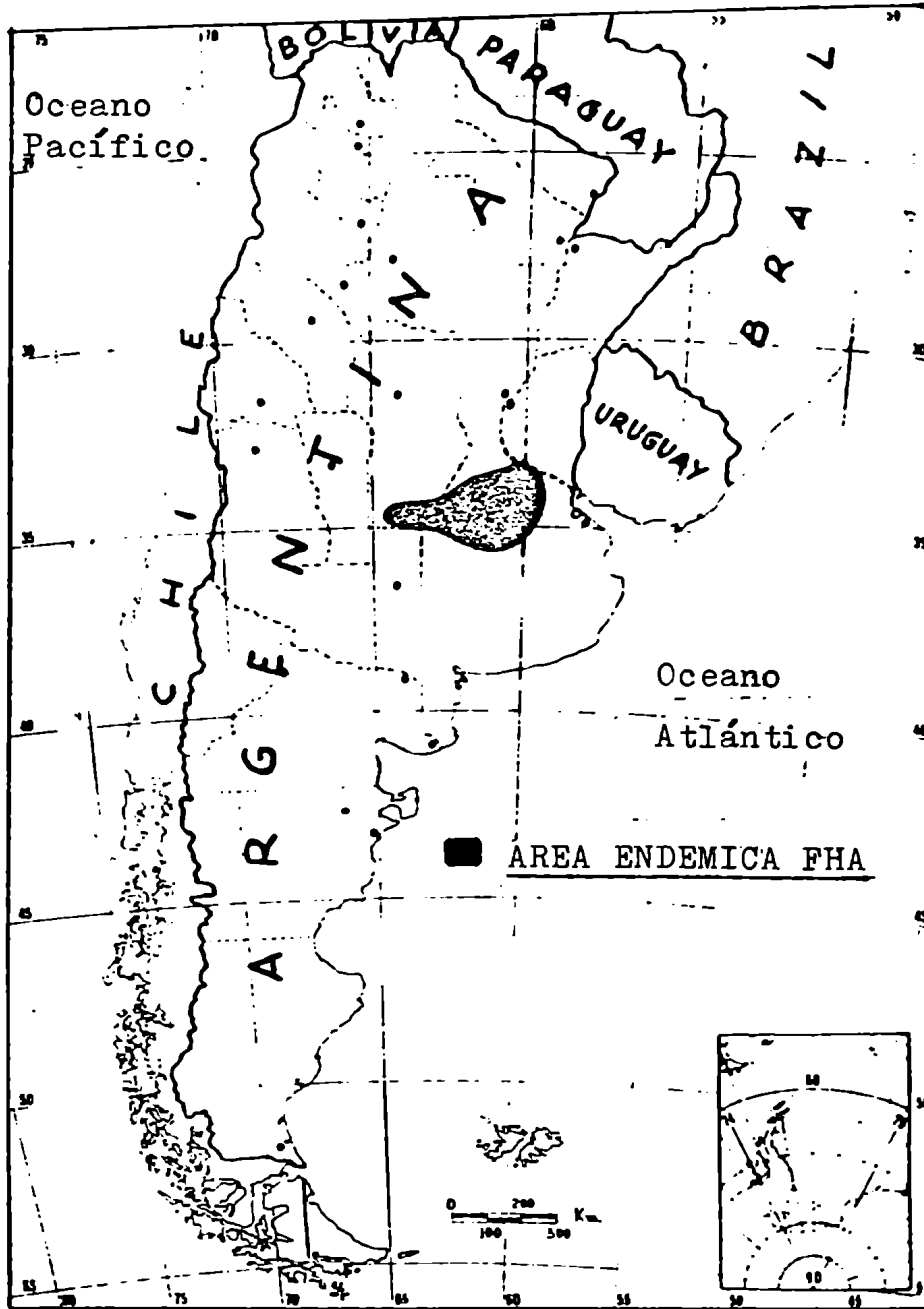
Los hallazgos de laboratorio muestran severas alteraciones en la coagulación (21), leucopenia, linfocitosis, trombocitopenia y neurotopenia (22), aumento de fosfatasa ácida y alcalina (23) y lípidos plasmáticos (24), disminución de las proteínas totales, albúmina y globulinas y un aumento de las β globulinas (25), (cuadro 3). Fueron demostradas profundas alteraciones del sistema complemento con activación de la vía clásica (26,27,28).

La respuesta humoral a la infección con virus Junín fue estudiada en cobayos inoculados con la cepa mutante XJ- Clon 3 (29). Se detectaron anticuerpos fijadores de complemento a los 20-30 días PI, que persistían por 30 días y el nivel descendía luego gradualmente. Los anticuerpos capaces de neutralizar al virus aparecieron más tarde persistiendo por largos períodos. Se encontraron alteraciones profundas de la respuesta inmune a otros antígenos en animales infectados con la cepa XJ prototipo del virus Junín.

Cuando los cobayos se infectan con la cepa virulenta XJ la capacidad para responder con una respuesta primaria o secundaria a antígenos particulados (glóbulos rojos) disminuye (30).

La inmunosupresión no se manifiesta cuando los cobayos son infectados con la cepa atenuada (29). Por último los cobayos experimentalmente infectados tienen una mayor reactividad a la endotoxina de Escherichia coli (31).

FIGURA 5



Argentina

CUADRO 1

GRUPO ARENAVIRUS - CARACTERISTICAS

LCM* (virus prototipo del grupo, distribución mundial)		
JUNIN*	(ARGENTINA)	VIRUS RNA
MACHUPO*	(BOLIVIA)	PM = $3,5 \times 10^6$
AMAPARI	(BRASIL)	Coefficiente de sedimentación:
PICHINDE	(COLOMBIA)	325-500 S
PARANA	(PARAGUAY)	DIAMETRO = 50-300 nm (media 110- 130 nm)
TAMIANI	(FLORIDA)	Infectividad es lábil a
LATINO	(BOLIVIA)	solventes de lípidos
TACARIBE	(TRINIDAD)	ácido
LASSA*	(AFRICA OCCIDENTAL)	radiación

* PATOGENOS PARA EL HOMBRE

CUADRO 2

ASPECTOS CLINICOS Y DATOS DE LABORATORIO EN PACIENTES CON FHA

PRIMEROS SINTOMAS	SINDROME VIRAL	(FIEBRE (TEMBLORES (DOLORES MUSCULARES (DOLOR DE CABEZA (DEBILIDAD (ANOREXIA (NAUSEAS Y VOMITOS
DEL 4º AL 9º DIA. DE EVOLUCION		(LEUCOPENIA (1200-3000 células/mm ³) (TROMBOCITOPENIA (PROTEINURIA (NITROGENO UREICO ELEVADO
SINTOMAS NEUROLOGICOS		(DESORIENTACION (DELIRIOS A CONVULSION (COMA.
CPK,LDK Y GOT ELEVADOS.-		

CUADRO 3

FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA EN COBAYOSASPECTOS CLINICOS:

leucocitos totales	3000 células /mm ³
plaquetas	30000 células /mm ³
disminución	(proteínas totales (albúmina (gammaglobulina
aumento	(beta globulinas (lípidos plasmáticos (niveles de catepsinas (proteínas ácidas (actividad de fosfatasa ácida y alcalina
vías de infección	(subcutánea (intramuscular (intraperitoneal (intracerebral (oral

CUADRO 3 (continuación)

Signos de la enfermedad

Entre el 5º y 8º día postinfección (fiebre
(pérdida de peso

Tiempo de muerte

Depende de la dosis infectante

(con 100 DL50 la muerte ocurre con shock hipotérmico entre el
día 11º y 15º postinfección)

Viremia

Persistente hasta la muerte

se
encuentra
virus

(ganglios linfáticos
(médula ósea
(hígado
(pulmones
(corazón
(bazo
(adrenales

Se excreta virus por orina pero no por materia fecal.-

Lesiones hemorrágicas

Petequias

Equimosis localizadas o hemorragias en tejido subcutáneo, intestino grueso y delgado, glándulas adrenales, g. linfáticos, paredes estomacales, pulmones, peritoneo o cavidad torácica.-

CAPITULO IV

Material y métodos

Animales: Se usaron cobayos de ambos sexos (Criadero Gutierrez) con un peso de 250-350 gramos alimentados con dieta de laboratorio corriente.

Los cobayos fueron inoculados intramuscularmente con 0.2 ml de material infectivo que contenía 100 DL50 de virus Junín. El virus fue diluido en solución balanceada Eagle con 3% de suero fetal bovino.

Virus: Se usó un stock de la cepa XJ prototipo del virus Junín consistente en un pool de plasma de cobayos infectados conteniendo $1 \times 10^{6,5}$ DL50/ml. La cepa XJ del virus Junín fue mantenida inoculando cobayos por vía intramuscular con plasma de cobayos infectados, diluida convenientemente en Buffer fosfato isotónico ph 7.4 conteniendo 2% de suero normal de conejo inactivado a 56°C por 60 minutos y antibiótico (1000 u/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomicina) (23)

Suero: Los cobayos fueron sangrados por vía intracardíaca 7 días antes de la infección para las muestras control y en los días 7,9,11 y 13 postinfección. Ningún animal fue sangrado más de una vez luego de la infección. La sangre coaguló a temperatura ambiente durante 1 hora y luego a 4°C. Los sueros fueron guardados a -70°C hasta su utilización.

Procedimiento utilizado en la titulación del complemento sérico (según Kabat y Mayer (36)).

La unidad hemolítica de complemento CH50 se define como la cantidad en mililitros de una dilución apropiada que lizará 2.5×10^8 glóbulos rojos óptimamente sensibilizados sobre el total de 5×10^8 en presencia de cantidades óptimas de Ca^{++} y Mg^{++} en un buffer de fuerza iónica 0.147 durante una hora de incubación a $37^{\circ}C$ en un volumen total de 7.5 ml.

Buffer utilizado:

CINa	85 gr
Veronal sódico	3.75gr
Veronal ácido	5.75 gr
Soluc.stock de	
Cl_2Mg 1 M y Cl_2Ca 0,30M	5 ml
H_2O destilada c.s.p.	2000 ml

Deberá conservarse a $4^{\circ}C$ y usarse en dilución 1:5. El buffer diluido debe descartarse si no se usa el mismo día de su dilución. Eritrocitos de carnero : Glóbulos rojos conservados a $4^{\circ}C$ en igual volumen de solución de Alsever. De esta manera los glóbulos se conservan hasta un mes si se guardaron condiciones adecuadas de esterilidad.

En el momento de usarlos se lavan tres veces en solución salina, el sobrenadante deberá ser límpido.

Para preparar la solución standar de eritrocitos el pellet de glóbulos centrifugados se suspende en solución buffer en una concentración tal que 1ml de la suspensión diluido con 14 ml de una solución 0.1% de CO_3Na_2 .

El valor de 0.700 en las condiciones antedichas corresponde a una concentración de eritrocitos de aproximadamente 1×10^9 células por ml, si los glóbulos provienen de animales sanos.

1 ml de la suspensión de glóbulos así preparada y que contiene 1×10^9 células, mezclada con partes iguales de la solución hemolisina (anticuerpo) proveerá la concentración de glóbulos sensibilizados necesaria indicada por la definición de unidades de complemento anteriormente enunciada (5×10^8 células en el volumen de 1 ml que es la cantidad que se agrega a cada dilución de complemento cuando se realiza su titulación).

Hemolisina: Está constituida por el suero de conejos inmunizados con glóbulos rojos de carnero y sangrados en el momento de máximo títu-

lo de anticuerpos. La hemolisina utilizada por nosotros provino del Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán" (se usaron 4 dosis hemolíticas).

Procedimiento seguido en la titulación del complemento:

Se colocó 1 ml de células sensibilizadas en tubos de centrifuga (mezcla en partes iguales de suspensión de glóbulos rojos y hemolisina en diluciones apropiadas), luego solución salina en cantidad adecuada hasta que el volumen final de reacción fuere de 7,5 ml.

Se agregó el volumen correspondiente de la dilución de suero problema (complemento). Se mezcló cuidadosamente y se dejó incubar en baño de temperatura constante a 37°C durante una hora agitando ocasionalmente.

En general se utilizó una dilución de 1/600 para el suero normal de cobayo y de 1/300 para los sueros de cobayos infectados en los últimos estadios de la enfermedad. Estas diluciones resultaron en la mayoría de los casos apropiadas para obtener valores que fueran útiles para la representación de una recta que se obtiene graficando $\log x$ en función de $\log (y/1-y)$, siendo x la concentración relativa de complemento expresada en ml e y el % de hemólisis/100.

Se encontró satisfactorio el uso habitual de tres o cuatro volúmenes distintos de las diluciones de complemento indicadas en el

párrafo anterior, pues con las mismas fué posible en general obtener por lo menos dos puntos útiles para construir el gráfico.

Durante la preparación todas las series de tubos implicadas en la titulación fueron mantenidas en un baño de agua helada, y los tubos de cada serie fueron colocados simultaneamente en el baño a 37°C.

Purificación de componentes de complemento

Los componentes C1 y C2 de cobayo fueron purificados parcialmente siguiendo las técnicas descritas por Tamura y Nelson (32) y Nelson y colaboradores (33).

El primer componente de cobayo (Clcob) se precipitó de suero normal de cobayo ajustando el pH a 7.4 y la conductividad hasta hacerla equivalente a la de una solución 0.04 M de ClNa (0.04 RSC). Para ello se prepararon soluciones standard de ClNa de concentraciones variables entre 0.01 y 0.3 M, midiendo con un conductímetro Phillips la resistencia de las mismas a 0°C. Con estos valores se construyó una curva standard de resistencias en función de la concentración de ClNa (RSC). La resistencia de las soluciones problema fue ajustada con respecto a la de las soluciones standard por dilución o agregado de ClNa 0.3 M según fuese necesario. El suero de cobayo diluido aproximadamente 4 veces con buffer PO₄ 0.005 M hasta lograr 0.04 RSC se mantuvo a 0°C con agitación constante durante 30 minutos. Luego se centrifugó en una centrífuga Sorvall refrigerada a 5000 r.p.m. con rotor S34 durante 20 minutos separando al precipitado del sobrenadante. El preci-

pitado se realizó con Buffer PO_4 0.005 M, ClNa 0.3 M, pH 7.4 y se reprecipitó por diálisis durante 4 horas contra buffer PO_4 0.005 M, pH 7.4 a 4°C. Después de lavar 3 veces el precipitado obtenido (con buffer PO_4 , 0.005 M) se redisolvió en solución de ClNa 0.3 M, PO_4 0.005 M, pH 7.4 en un volumen cinco a diez veces menor que el volumen original de suero. Un procedimiento similar se aplicó para la preparación de Cl humano a partir de plasma recalificado (32).

A partir del sobrenadante de la purificación de Cl de cabaño se obtuvo C2 funcionalmente puro según los criterios de Nelson (33). El sobrenadante cuya resistencia se ajustó a RSC 0.075 fue aplicado sobre una columna de 5 x 30 cm de DEAE celulosa equilibrada con buffer PO_4 0.005 M, pH 7.4-7.5, RSC 0.075. En estas condiciones C2 eluye de la columna. El volumen eluido fue ajustado a pH 5.0 con buffer acetato pH 5.0 1M y ácido acético 1M. Luego se corrigió su conductividad fijándola en 0.075 RSC y se aplicó sobre una columna de CM celulosa de 2.5 x 30 cm equilibrada con buffer acetato 0.02 M pH 5.0 RSC 0.075. El eluato fue neutralizado y concentrado hasta el volumen original del suero empleado. Tanto Cl como C2 fueron probados para determinar su actividad

funcional y la contaminación con otros componentes de C. Las preparaciones funcionalmente puras tienen por lo menos 1000 veces más actividad del componente de C enriquecido que de otros componentes medidos con ensayos hemolíticos.

C1 y C2 se conservaron hasta su uso fraccionados en alícuotas en congelador de -70°C .

Valoración de C1 (Metodo de Borsos y colaboradores modificado)(34)

Aliquotas de 0,25 ml de dobles diluciones de C1 en DVBS, se incuban a 37°C durante 10 minutos, con 0,25 ml de EAC⁴ 1.5×10^8 /ml en DVBS. Luego de lavar tres veces a temperatura ambiente con DVBS, las células EAC⁴ se suspenden en 0.5 ml de DVBS y se añade 0.25 ml de C2 cob 50 SFU. ml. Se incuban a 37°C durante 10 minutos y se agrega 3.0 ml de suero de cobayo diluido 1/50 en EDTA-VBS (C-EDTA 1/50). La mezcla se incuba a 37°C 90 minutos y luego de centrifugar a 2000 r.p.m.^{Se} lee la absorción a 412. Calculando el grado de hemólisis en base al 100% de lisis obtenido hemolizando 0.25 ml EAC⁴ con 3.5 ml de agua, y una vez deducidos los valores de hemólisis alcanzados por los testigos en ausencia de C1 y C2 se calcula el valor de z de acuerdo a la ecuación de Poisson, $z = \ln(1-y)$. Z equivale según la teoría de "un impacto" (one hit) al número de sitios promedio por cada célula y el número de unidades SFU de una preparación se deduce de la inversa de la dilución de la preparación original que arroja un valor de $Z = 1.0$

Valoración de C4

Se incuban dobles diluciones de C4(0.25 ml) en DVBS durante

15 minutos con 0.25 ml de EAC1 1.5×10^8 a 37°C. Luego se agrega 0.25 ml de C2 cob 30 SFU/ml y se incuba a 37°C durante 30 minutos al cabo de los cuales se añade ~~C~~EDTA 1/50, 3.0 ml y se incuba 90 minutos a 37°C. El sobrenadante de la reacción se analiza de igual manera que para la titulación de C1.

Valoración de C2

Se incuban dobles diluciones de C2 (0.25 ml) humano o de cobayo durante 30 minutos con 0.25 ml de EAC14 (humano o de cobayo respectivamente). Luego se agregan 3.0 ml de ~~C~~EDTA 1/50 y se incuba a 37°C durante 90 minutos.

La actividad de C2 se calcula de manera análoga a la de C4 y C1.

Cálculo de moléculas efectivas por ml

En número mínimo absoluto de moléculas de un componente titulado hemolíticamente se calcula a partir del valor de unidades formadoras de sitios (SFU) y del número de eritrocitos en estado de complejo intermediario en el sistema.

$$\text{N}^{\circ} \text{ moléculas efectivas/ml} = \text{SFU} \times 10^8 / \text{ml}$$

Valoración del nivel total de complemento humano

Para el análisis de las muestras en los estudios clínicos la actividad hemolítica total de C fue valorada con la técnica Kent y Fife (37). Los valores normales en suero humano de acuerdo a esta técnica fueron :227 unidades CH50/ml(190-257).

Valoraciones hemolíticas de los componentes

Para la valoración de C1, C2 y C4 se siguieron los métodos delineados por Borsos (34) y Ruddy y Austen (35). Los buffers empleados se prepararon a partir de soluciones stock de acuerdo a Mayer (36).

Solución Veronal 5x

Veronal sódico 10.19 gr

Na Cl 83.0 gr

Disolver en 1.5 l H₂O

Ajustar a pH 7.3-7.4 con aproximadamente 35ml de HCl 1.0 N

Enrasar a 2.0 l.

Solución EDTA 0.1 M. pH 7.4

EDTA disódico 37.22 gr. Ajustar a pH 7.3 con NaOH 1.0 N.

Enrasar a 1.0 l.

Solución Stock de Ca⁺⁺ Mg⁺⁺

0.15 M CaCl₂

1.0 M MgCl₂

VBS (solución de reposición semanal)

100 ml Veronal 5x

0.5 ml Solución stock $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$

0.5 g gelatina disuelta en agua

Agua destilada cantidad suficiente para 500 ml

DVBS

50 ml Veronal 5x

0.5 ml Solución stock $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$

0.25 g gelatina disuelta en agua

12.5 g dextrosa o glucosa

Agua cantidad suficiente para 500 ml

EDTA-VER

100 ml Veronal 5x

50 ml EDTA 0.1 M

0.5 g gelatina disuelta

Agua c.sp. 500 ml

Preparación de complejos celulares intermediarios

EACI cob

Los eritrocitos ovinos (E) lavados 4 veces y sensibilizados con anticuerpos antiE, 10 unidades, (EA), fueron ajustados a concen-

tración 1×10^9 según fuera descripto previamente (36). Las unidades hemolíticas SFU (unidades formadoras de sitios) fueron las definidas por Borsos y colaboradores (34); una unidad SFU es la unidad capaz de provocar un sitio (S) activo por célula (34).

Para preparar EAC1/5 ml de EA 1×10^9 /ml en DVBS se incubaron 15 minutos a 37°C con 1000 SFU de Cl cob diluido en DVBS.

Las células EAC1, lavados 3x con DVBS a temperatura ambiente se ajustaron a 1×10^9 /ml conservándose hasta su uso a 4°C (estos complejos intermediarios son activos 24 horas). Al realizar la titulación de C4, las células EAC1 se ajustan a 1.5×10^8 /ml.

EAC1 cob 4 hum (34)

Se mezcló un volumen de EA 1×10^9 /ml con un volumen de Cl cob conteniendo 1000 SFU y se incubaron a 37°C , 10 minutos. Luego se añadió 5 volúmenes de suero humano diluido 1/25 en EDTA-VBS y se mantuvo a 0°C 20 minutos. Luego de lavar dos veces las células con EDTA-VBS centrifugando a 2000 r.p.m. en una centrífuga Internacional refrigerada a 4°C , se suspendieron en DVBS a 1.0×10^9 EAC4/ml. inmediatamente antes de su uso se agregó igual volumen de Cl 50 SFU/ml y se incubó la mez-

cla a 37°C durante 10 minutos. Las células EAC1cob⁴hum se lavaron 2 veces con DVBS a temperatura ambiente y se suspendieron a 1.5×10^8 EAC1⁴/ml para la titulación de C2 humano.

EAC1⁴ y EAC⁴ cob

Se suspenden EA (1×10^9 /ml) en DVBS y se enfrían a 0-2°C en baño de hielo. Luego se añade 0.3 ml de suero de cobayo fresco, a 0°C por cada ml de EA 1×10^9 /ml. La mezcla se agita y se mantiene a 0°C por 6 minutos. Luego se lava 2 x con DVBS helado y se suspende en VBS.

Con el fin de decaer las células que hayan alcanzado estado EAC1⁴2 o más avanzado, se incuban a 37°C durante 90 minutos, al cabo de los cuales se lavan dos veces con DVBS y se suspenden en DVBS a 1.0×10^9 ml EAC1⁴.

Para preparar EAC⁴ cob, se suspenden 10 ml de EAC1⁴ cob 1×10^9 /ml en EDTA-VBS y se incuban a 37°C 10 minutos.

Luego de lavar dos veces con EDTA-VBS y dos veces con DVBS se suspenden hasta su uso a una concentración de 1×10^9 /ml y se conservan a 4°C. Para titular C1 o sus subunidades se diluyen hasta obtener 1.5×10^8 EAC⁴/ml.

Método de purificación de Clq

Para el aislamiento de este subcomponente se siguió una modificación del método originalmente descrito por Yonemasu y Stroud (41).

A 100 ml de suero humano normal se agregaron 10 ml de solución de EDTA 0.014 M, pH 7.5 y se dializaron contra 1000 ml de EDTA 0.014 M, pH 7.5, RSC 0.035, durante 15 hs a 4°C, cambiando una vez el líquido de dialisis. Se centrifugó la suspensión a 2000 r.p.m., 4°C durante 30 minutos en una centrifuga International PR2 y al precipitado obtenido se lavó una vez con EDTA 0.014 M. Luego se disolvió con 20 ml de buffer de acetato, pH 5.0, 0.02 M, 0.75 M ClNa. Esta solución se reprecipitó por diálisis a 4°C contra 1800 ml de EDTA 0.06 M, pH 5.3 RSC 0.065 durante 2 horas, cambiando el líquido de dialisis y prosiguiendo la misma durante 2 horas adicionales. Luego se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C, se lavó 2 veces con el mismo buffer y se disolvió en 8 ml de buffer PO₄ 0.005 M, pH 7.5, 0.75 M ClNa. La preparación de Clq se conservó dividida en alícuotas y congelada a -70°C hasta su uso.

Valoración de componentes de complemento por inmunodifusión radial

Se empleó la técnica de Mancini, Carbonara y Heremans (38) para inmunodifusión radial, utilizando como soporte Agarosa (Seakem, o Agaros A 37, L' Industrie Francaise Biologique, Genevilliers) 1.2% en solución salina buffereada con fosfatos, 0.01 M, EDTA 0.01 M. Los antisueros monoespecíficos fueron obtenidos inyectando los antígenos proteicos purificados en conejos por vía intradérmica o subcutánea. Estos fueron controlados inmunolectroforéticamente y cuando fue necesario absorbidos. El antisuero anti C3 se preparó por inyección de C3 absorbido a Zymosan (39) y el suero anti C4 se obtuvo por inyección de los precipitados específicos C4-antiC4 obtenidos por inmunolectroforesis en agar. Como referencia para estas valoraciones se utilizó un pool de 10 sueros humanos normales al que se le atribuyó un valor relativo de 100%. Los resultados se relacionaron con los valores obtenidos con el suero standard y se expresaron como porcentajes del valor del pool normal ($\%N$).

La cantidad de antisuero monoespecífico incluido en el medio de agarosa se seleccionó en base a la potencia del antisuero y a la concentración del antígeno a medir.

Preparación de Z:

La inactivación de C3 en el suero de cobayo o humano se obtuvo por tratamiento de un pool de los mismos con zimosan(39).

La suspensión de zimosan en 10 ml de solución salina durante media hora (30 minutos de hervor). Centrifugar. Descartar sobrenadante y resuspender el sedimento en 100 ml de solución salina. Esta constituye la suspensión stock que contiene 1 mg de zimosan por ml y puede guardarse hasta el momento de su uso a 4°C. Previamente a su utilización será necesario agitarla convenientemente, pues es de suma importancia el hecho de que las partículas de zimosan se hallen perfectamente dispersas.

Dado que el suero de cobayo tiene alto título en C3 será necesario utilizar por lo menos quince veces la cantidad recomendada para inactivar el C3 en suero humano, o sea 1.35 ml de la suspensión stock anterior por cada ml de suero. Esta cantidad dependerá, en última instancia de la actividad de C3 que posea el suero y también de la actividad del zimosan empleado. La cantidad requerida de solución stock de zimosan a utilizarse se centrifugó descartándose luego el sobrenadante. El

pellet obtenido se lavó dos veces con buffer complemento y con 1 ml del pool de sueros y se resuspendió la mezcla cuidadosamente. Se incubó a 37°C en baño de agua durante una hora, agitando ocasionalmente. Después del incubado se centrifugó y el pellet se usó para inocular los conejos.

Inmunoelectroforesis:

Para los estudios de inmunoelectroforesis, se empleó la técnica de Scheidegger (40) utilizando buffer de veronal- ClH ph 8,6 ; fuerza iónica 0,05 ; EDTA 10 mM.

Procedencia de los antisueros monoespecíficos utilizados:

anti C4 humano
 anti Clq "
 anti Clr "
 anti Cls "
 anti Cl inh "
 anti C3 cobayo

} Preparados en nuestro laboratorio

anti factor B humano

Laboratorio Behringwerke

anti C3 humano

Laboratorio Immunoquemia

anti Clq humano

Dr C. L. Christian

anti C3 inactivador

Dr P. Lachmann

anti C4 cobayo

Dr M. Franck

anti γ de cobayo

Dra D. B. Budzko

anti C5 humano

Dr A. Dalmaso

Técnica para la búsqueda de complejos inmunes circulantes; con Clq

marcado con I¹²⁵ :

Se usó el procedimiento descrito por Zubler y colaboradores (42).

Preparación de enzimas lisosomales de cobayo: (43):

A cuatro volúmenes de sangre de cobayo se agrega un volumen de EDTA 10 % en agua y se mezcla con un volumen de Dextran 250 al 6 % en solución salina. Se sedimenta a 37°C durante 40 minutos, se centrifuga y las células se lavan dos veces con solución salina. Se lisan los glóbulos rojos con ClNH_4 0,75 gr % en buffer Tris 0,02 M ph 7,2-7,4 durante tres minutos. Se ajusta la concentración de polimorfomucleares a 10^8 / ml y se procede a lisar las células con seis ciclos de congelación y descongelación. La preparación se centrifuga a 5000 rpm durante 30 minutos en frío. El sobrenadante límpido se guarda a -70°C hasta su uso.

Método de determinación de proteínas :

Se usó el procedimiento de Folin-Ciocalteu, modificación de Lowry (44).

Cromatografía en columna de Sephadex G-200:

Se empleó una columna de 2,5 cm X 65 cm sobre la que se aplicó 0,5 ml de suero de cobayo experimentalmente infectado con virus Junín correspondiente al día 14 post-inoculación. La elución se efectuó con buffer de borato 0,25 M ph 8.

CAPITULO V

**Alteraciones del sistema complemento
en la fiebre hemorrágica argentina
experimental del cobayo**

La Fiebre Hemorrágica Argentina puede producirse experimentalmente en cobayos infectándolos con virus Junín y en algunos aspectos la enfermedad inducida se asemeja a la FHA espontánea humana (16).

En otras fiebres hemorrágicas (45) se han observado alteraciones del sistema C similares a las de las de la FHA, coincidentes con la activación de la coagulación (11). En este caso se discutió el papel de los productos de fragmentación de C en la producción de shock (45).

En este capítulo se presentarán las evidencias de activación del mecanismo clásico del sistema C en cobayos experimentalmente infectados con virus Junín.

La producción de lesiones de carácter inmunológico inducida por anticuerpo o complejos antígeno-anticuerpo requiere generalmente la participación de mediadores. El sistema C, presente en el suero, es un potente generador de los mismos.

Ya en trabajos previos Budzko y colaboradores (26) habían demostrado un descenso del nivel de C total y productos de degradación del componente C3 en el estadio agudo de la enfermedad del cobayo.

El descenso del nivel total de C en ausencia de una deficien-

cia congénita de alguno de sus componentes puede deberse a : consumo por vía clásica o alternativa, alteraciones en el metabolismo o a cambios en la distribución en los espacios intra o extravasculares.

Una de las maneras de poder discriminar cuál es el mecanismo implicado consiste en realizar la medición de los componentes iniciales C1, C4, C2, C3 cuyos descensos en caso de ocurrir nos indicarían una posible activación de la vía clásica.

Como animales de experimentación se utilizaron cobayos de alrededor de 300 gramos de peso. Los animales se infectaron con 100 DL50 (ver "Material y métodos) de virus Junín.

Con la dosis de virus empleada la muerte de los cobayos se produjo entre los días 12-15 PI revelando la autopsia hemorragias y petequias en piel y suprarrenales.

El nivel de C total y los componentes C4 y C2 se midieron por técnicas hemolíticas expresándose los resultados en unidades hemolíticas al 50% (CH50) y en unidades formadoras de sitios (SFU) para C4 y C2.

Clq y C3 se valoraron por inmunodifusión radial empleando anti Clq humano (con reacción cruzada para Clq de cobayo) y anti C3 de caba-

yo. Los resultados se expresaron en unidades porcentuales con respecto a un pool de suero normal.

En la tabla 1 se presentan resultados de las valoraciones de los componentes iniciales durante el período sintomático de la enfermedad. Hasta el día 7º PI los componentes Clq, C4 y C2 se mantuvieron dentro de los límites normales. En el día 9º PI se alcanzaron los valores más bajos del componente C4 extendiéndose este marcado descenso a todos los animales en los días posteriores.

En el día 14º PI, se sangraron nuevamente los animales sobrevivientes comprobándose la persistencia de los descensos observados.

Este perfil con Cl bajo, C4 muy descendido y disminución de C2 es un perfil característico de activación de la vía clásica.

En la figura 6 se representa el estudio completo del nivel hemolítico total y los componentes iniciales, donde se puede apreciar la evolución paralela de los mismos.

Los resultados de este estudio sugieren la activación del mecanismo clásico. Esta puede ser el resultado de la interacción de Clq con complejos inmunes, aunque la presencia de enzimas proteolíticas ac-

tuando directamente sobre Cl pueden producir resultados similares.

Cabe agregar que la búsqueda de complejos inmunes solubles resultó negativa pero fué hecha en sistema heterólogo, es decir usando un Clq radiactivo de origen humano(46).

TABLA I

	CH50 u/ml	Clq %N	C4 SFU/ml	C2 SFU/ml	C3 %N
PRE INFECCION (18)	276 ± 12	100 ± 7	60369 ± 4796	7139 ± 304	102 ± 5
POST INFECCION					
Día 7º (4)	272 ± 20	90 ± 16	63125 ± 21261	6365 ± 354	80 ± 8
Día 9º (5)	124* ± 45	57 ± 11	22140 [■] ± 7862	3240* ± 1154	53* ± 13
Día 11º (5)	180* ± 22	64 ± 6	23323 [★] ± 3722	5305* ± 827	72 [■] ± 10
Día 13 º (5)	165* ± 29	74 [★] ± 9	16172 [★] ± 3824	5085 ± 857	70* ± 6

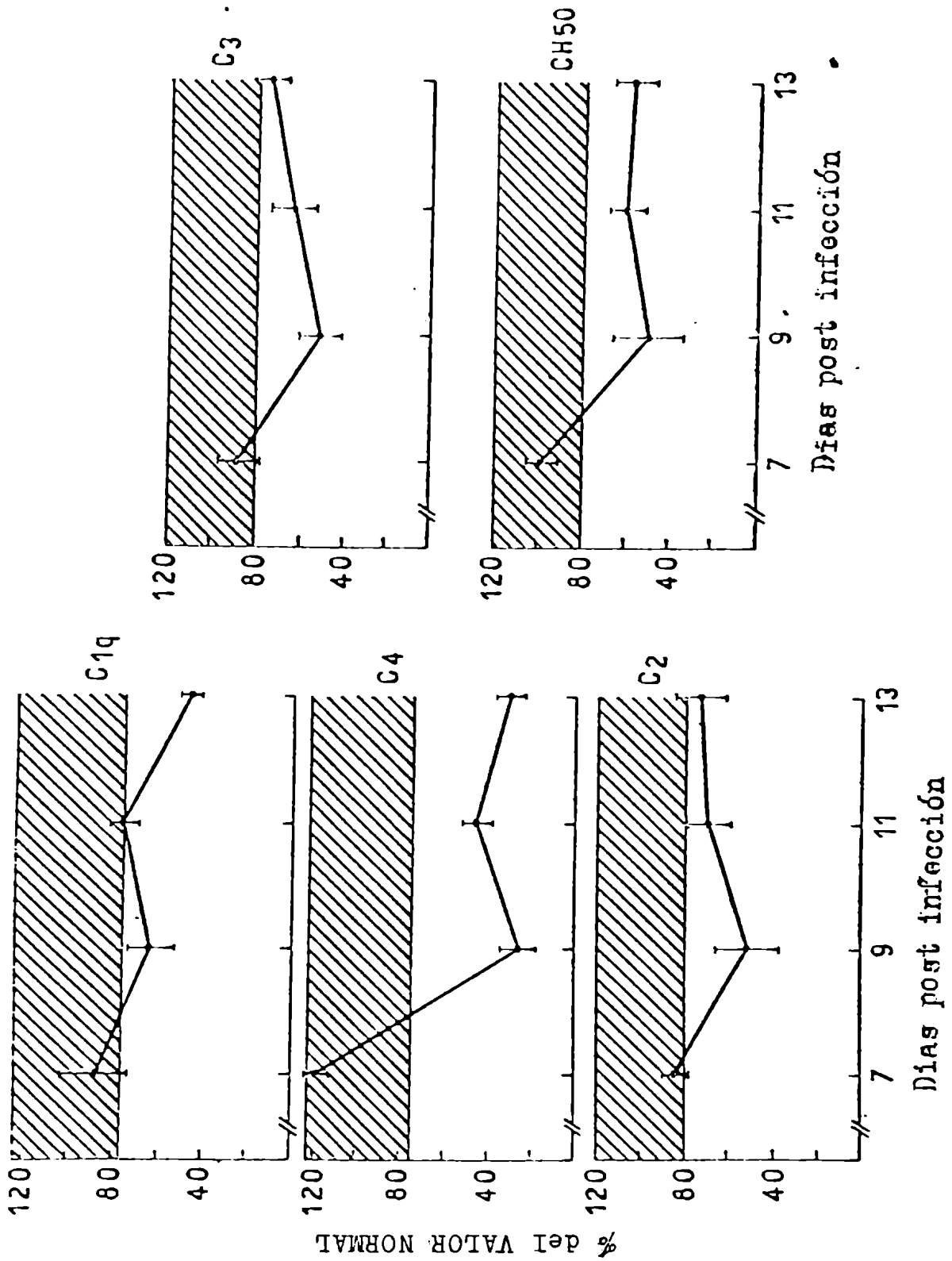
* p < 0,05

■ p < 0,01

★ p < 0,001

Perfil del sistema C en la FHA experimental: se presentan los valores medios con su error, de las valoraciones del nivel hemolítico total y de los componentes Clq, C4, C2 y C3 en los sueros infectados en el período agudo de la enfermedad. Entre paréntesis el número de animales por grupo.

FIGURA 6



Evolución paralela del nivel hemolítico total y de los componentes medidos del sistema complemento, ofreciendo un perfil característico de activación de la vía clásica.

CAPITULO VI

**Ineficiencia hemolítica del componen-
te C₄ del suero de cobayos experimen-
talmente infectados con virus Junín**

En el capítulo V se demostró que en los períodos finales de la enfermedad experimental del cobayo inoculado con virus Junín (FHA exp) se observa un marcado descenso del complemento sérico total, de la concentración proteica de Clq y C3 y de la actividad hemolítica de C4 y C2. El objetivo de estos estudios es discutir la disociación existente entre los niveles funcionales del componente C4 y su concentración proteica en el suero de cobayos con FHA exp.

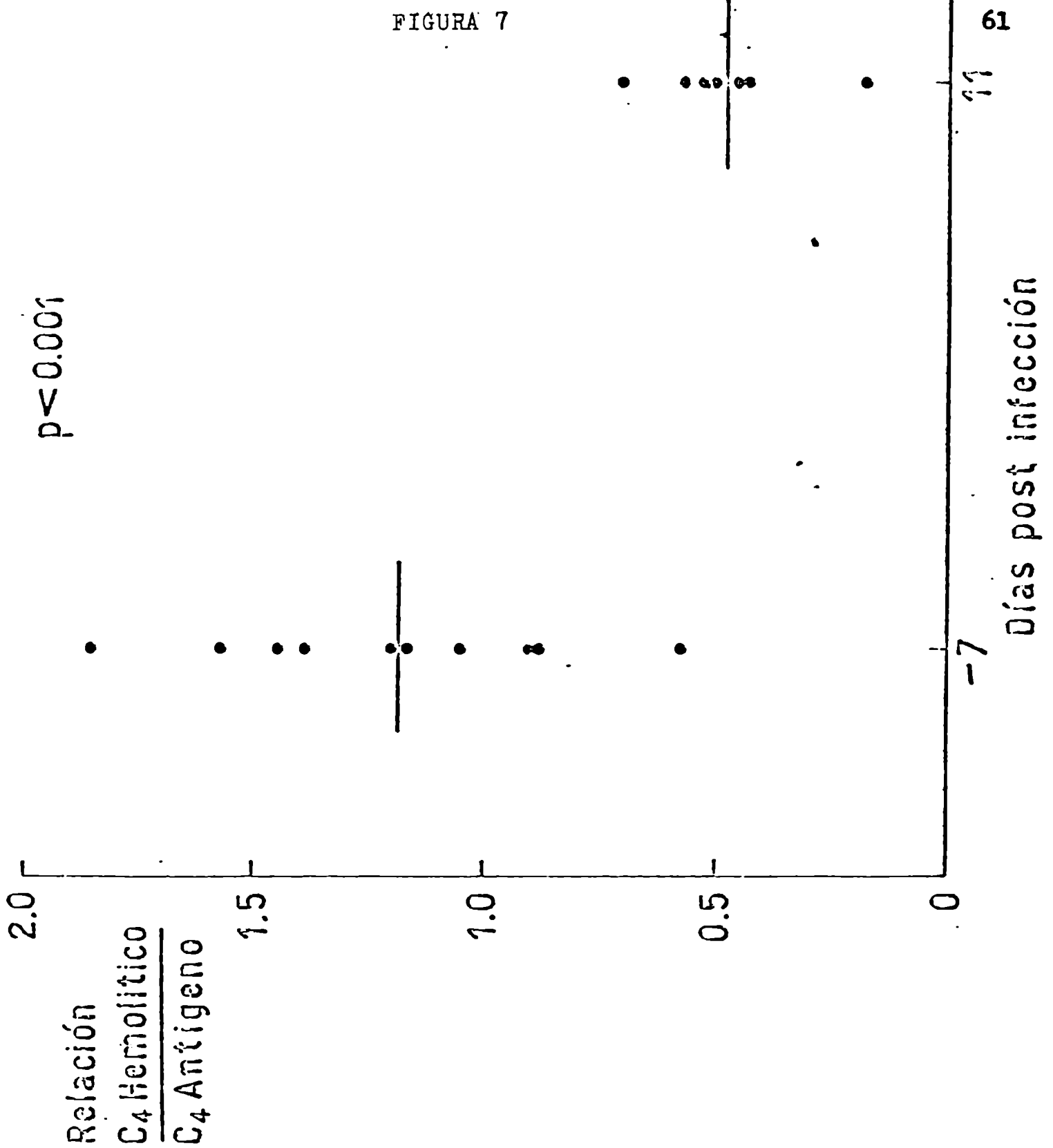
Se usaron cobayos de aproximadamente 300 g de peso inoculados con 100 DL50 de virus Junín, cepa X3, prototipo (ver "Material y Métodos"). Las muestras se recogieron en el día 11º PI y en los días 7º, 9º, 11º y 13º PI. El componente C4 fué medido con técnicas hemolíticas utilizando complejos intermediarios. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de sitios (SFU) o en valores porcentuales con respecto a un pool de sueros normales. También se cuantificó el contenido antigénico de C4 empleando métodos de inmunodifusión radial utilizando suero de conejo anti C4 de cobayo monoespecífico, expresándose los resultados en % del valor normal.

Al calcular el cociente C4 hemolítico/C4 antígeno se observó

que dicha relación desciende significativamente y en forma progresiva alcanzando valores de aproximadamente 30% del inicial en el día 13^oPI, figura 7. Esto revela una notable disminución en la eficiencia hemolítica de C₄ en los animales infectados, requiriendo mayor concentración proteica de este componente para alcanzar un nivel hemolítico determinado, figura 8. Es interesante notar que de acuerdo a los datos presentados en el capítulo previo C₄ es el componente de actividad hemolítica más afectado en la FHA exp. En condiciones normales, el título lítico de C₄ en suero es correlativo a la concentración proteica, pues los productos de degradación tienen vida menor que el C₄ nativo (fig 9).

La acumulación de C₄ funcionalmente inactivo en los cobayos infectados con virus Junín puede deberse a la gran producción de fragmentos de degradación durante el período agudo (día 9 PI) subsecuente a un aumento inicial en el tenor de C₄ antes del período sintomático de la enfermedad (día 7 PI y anteriores).

FIGURA 7



Se infectaron 10 cobayos con 100 BL50 de virus Junín cepa XJ, y se sangraron al día 11 post infección. La relación C4 Hem/ C4 Ag disminuye significativamente con respecto a los valores de los mismos animales pre infección.

Evolución de los niveles funcionales y concentración proteica del componente C4 demostrándose la ineficiencia hemolítica de dicho componente en el período agudo de la enfermedad experimental.

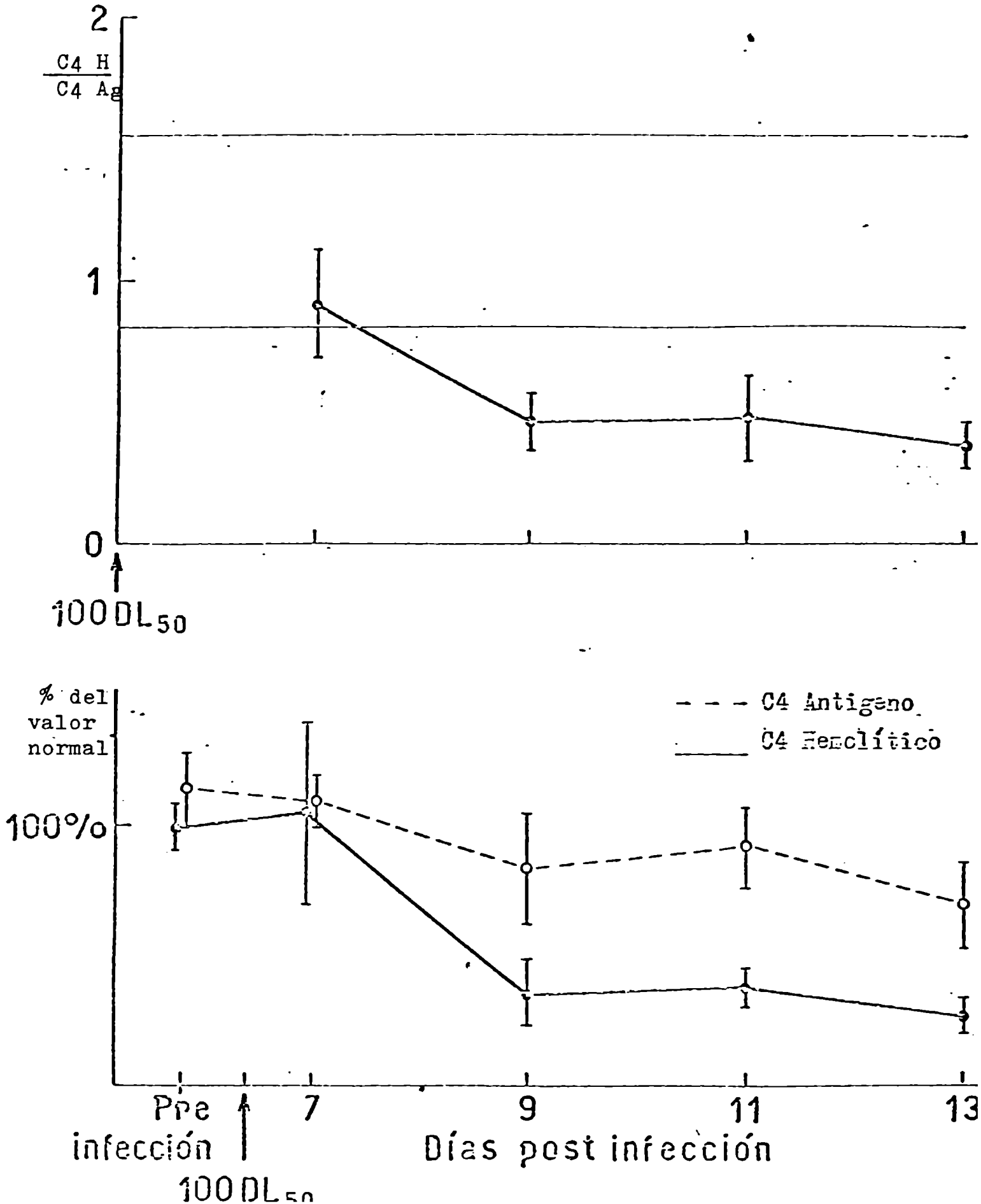
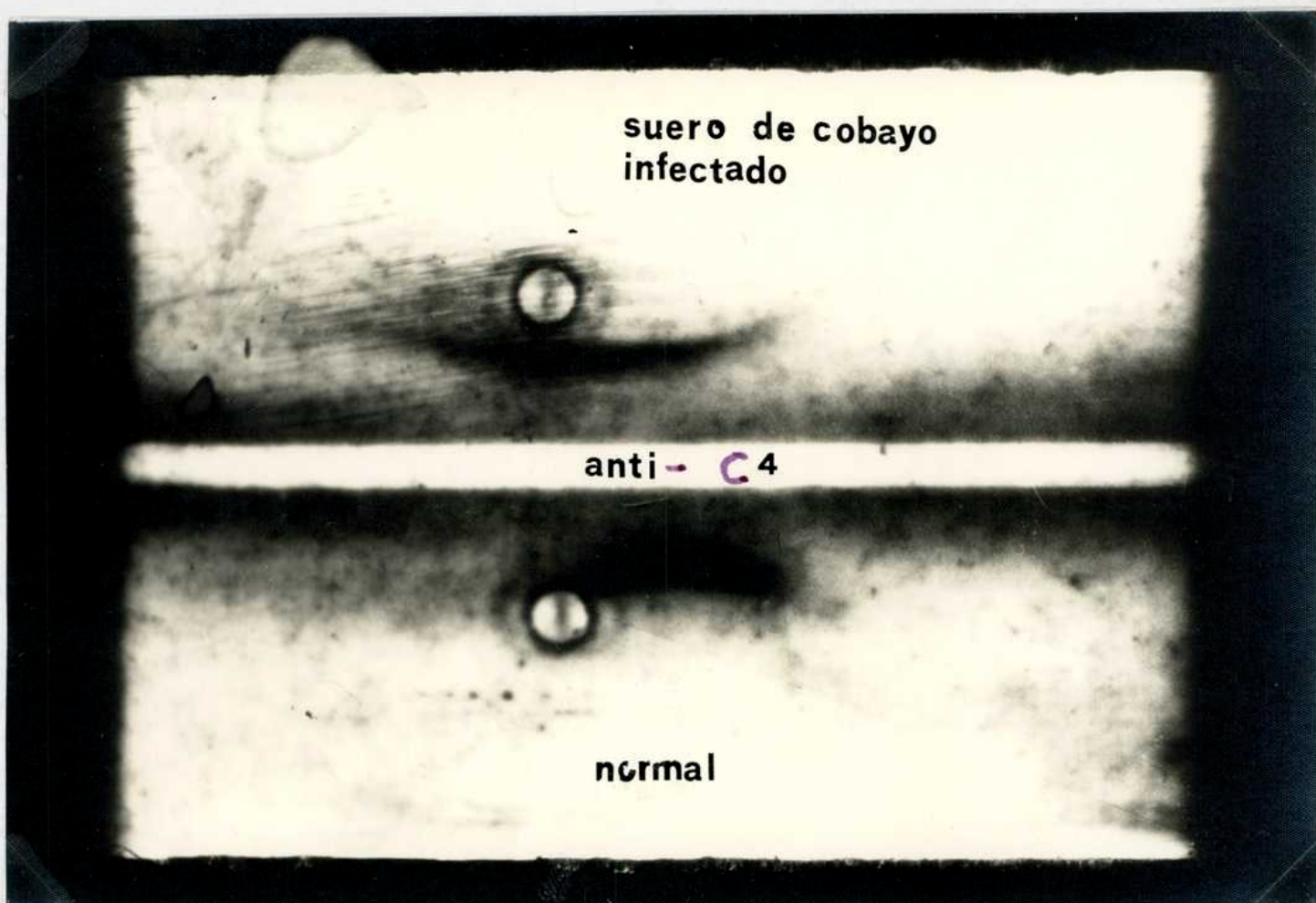


FIGURA 9



Presencia de productos de degradación del componente C4, en el suero de cobayo infectado con virus Junín, con mayor movilidad electroforética.

CAPITULO VII

**Mecanismos de activación del sistema
complemento en la fiebre hemorrágica
experimental del cobayo**

Todo lo expuesto en los capítulos V y VI de esta tesis puede ser compatible con una activación desencadenada por complejos inmunes como en el caso del dengue asiático. Sin embargo, en el dengue, la activación ocurre en individuos sujetos a reinfecciones con altos títulos de anticuerpos antivirales y complejos inmunes circulantes (45). En el caso de la FHA con técnicas convencionales no se habían demostrado anticuerpos antiviral Junín y existe evidencia de un estado de inmunodepresión (30).

Por causa de estos hallazgos decidimos investigar que otros factores podrían determinar la activación de C con persistencia de sus productos de degradación o componentes inactivos.

Para esto estudiamos el efecto del suero de cobayo infectado (Scob FHA) sobre la actividad de C de sueros de cobayos no infectados (Scob N) o sueros humanos normales (SHN).

En la tabla 2 se demuestra que el Scob FHA consume el C de sueros normales siendo más activo sobre el suero humano. La reacción requiere incubación a 37°C.

Con el fin de averiguar si el consumo de la actividad hemo-

lítica ocurría a través de la vía clásica se estudió el efecto de la incubación de diferentes diluciones del Scob FHA sobre el suero indicador (SHN) evaluando el consumo total de C y de C⁴.

Los resultados presentados en la Tabla 3 demuestran que hubo activación a través de la vía clásica como en los cobayos infectados "in vivo".

Se investigaron algunas características del factor/es activante de C en Scob FHA, demostrando su termoestabilidad a 56°C (Tabla 4). Luego se trató de establecer si se trataba de complejos o agregados de alto peso molecular, para lo que se ultracentrifugó Scob FHA a 82000 g durante 1 hora y se demostró que la actividad inhibitoria persistía en el sobrenadante (figura 10). Al estudiar el perfil de elución de Scob FHA en una columna de Sephadex G-200 (figura 11), la actividad inhibitoria eluyó entre la albúmina y la hemoglobina, excluyendo la posibilidad de que se trate de complejos de alto peso molecular.

En cuanto a los requerimientos para que la reacción suceda, se estudió en primer lugar la acción de agentes quelantes de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (EDTA y EGTA). Los resultados presentados en la Tabla 5 demuestran que

la reacción de consumo es $\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$ dependiente.

Para evaluar la posibilidad de que este factor inactivante ejerza su efecto en forma directa sobre C_4 saltando el paso de activación de C_1 , se estudió su acción sobre sueros indicadores carentes de C_1 . Los resultados de la Tabla 6 demuestran que la integridad del primer componente es indispensable para evidenciar la acción inhibitoria de Scob FHA, ya que no hay consumo de C_4 en sueros deficientes en C_1 , ni en suero calentado a 56°C para destruir C_1 .

Los resultados presentados demuestran que en la FHA exp. hay activación de C con compromiso de la vía clásica. Esta activación no parece estar relacionada a la presencia de complejos inmunes circulantes como lo indican los experimentos "in vitro" que demuestran que la actividad inhibitoria de C no se relaciona a sustancias de alto peso molecular.

La causa de la activación de C no se ha establecido aún, pero es de interés destacar que extractos leucocitarios ricos en enzimas lisosomales tienen una actividad similar sobre el C sérico, en cuanto al consumo de C_4 y al papel de Ca^{++} y Mg^{++} (Tabla 7 y 8). En la FHA exp se han demostra-

do enzimas lisosomales circulantes durante el período agudo, probablemente como consecuencia de la destrucción de leucocitos polimorfonucleares (23).

De todas maneras el hecho de que ocurra en la FHA exp. un fenómeno de activación masiva del sistema C puede ser un factor de importancia determinante en la activación de los macrófagos, en cambios de la permeabilidad vascular o en la activación de la coagulación.

TABLA 2

Efecto de la incubación de Scob FHA sobre la actividad hemolítica de SHN y Scob N

Incubación	% Lisis SHN		% Lisis S cob N	
	37°C	0°C	37°C	0°C
1 hr				
Scob FHA	1.4	74	47	77
Buffer VBS	38	78	63	75

Se incubó Scob FHA (pool de suero de cobayos infectados con 100 D150 9º día p.i.) diluído 1/10 con buffer veronal-salino pH 7.4, con suero indicador de cobayo normal 1/5 e humano normal 1/2 a 37°C o a 0°C durante 1 hora y se determinó la capacidad lítica residual (% de lisis) en comparación con los mismos sueros indicadores en ausencia de Scob FHA.

TABLA 3

Efecto del suero de cobayo FHA sobre la actividad hemolítica total y el título de C4 de suero humano normal indicador

Incubación, 1 hr 37°C SHN 1/2	CH50 u/ml	C4 SFU/ml
Scob FHA 1/20	64	650
1/40	68	1050
1/80	77	2165
VBS	114	1760

Incubación del suero de cobayo infectado con virus Junín, en distintas diluciones, con suero indicador de activación del sistema C. (suero humano normal). Se observa un consumo dependiente de la dilución usada con participación de componentes de la vía clásica (C4).

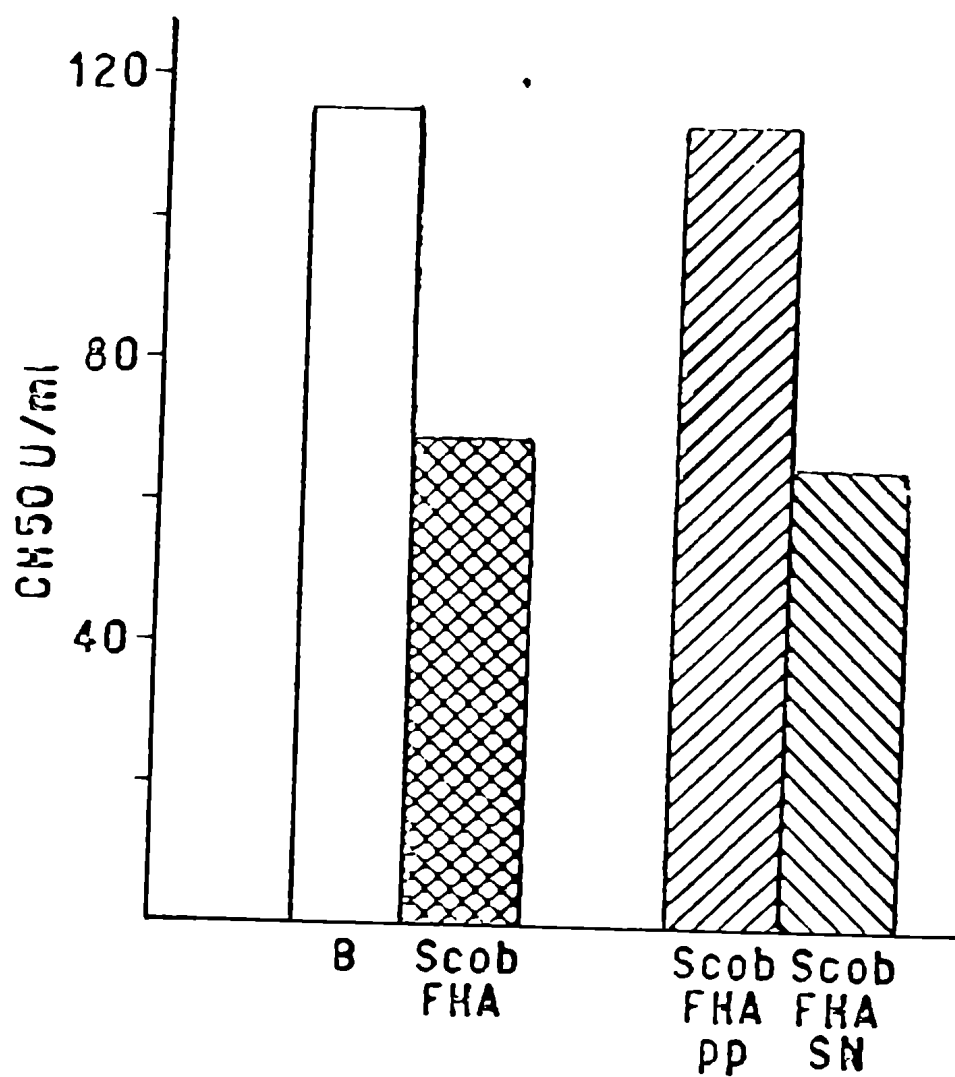
TABLA 4

Efecto del calentamiento sobre la actividad inhibitoria de Scob FHA

Incubación, 1 hr 37°C SHN 1/2	CH50 u/ml	C4 SFU/ml
Scob FHA 1/20	63	650
Scob FHA 1/20, 56°C	60	725
Scob N 1/20	137	1337
Scob N 1/20, 56°C	108	1100
VBS	115	1760

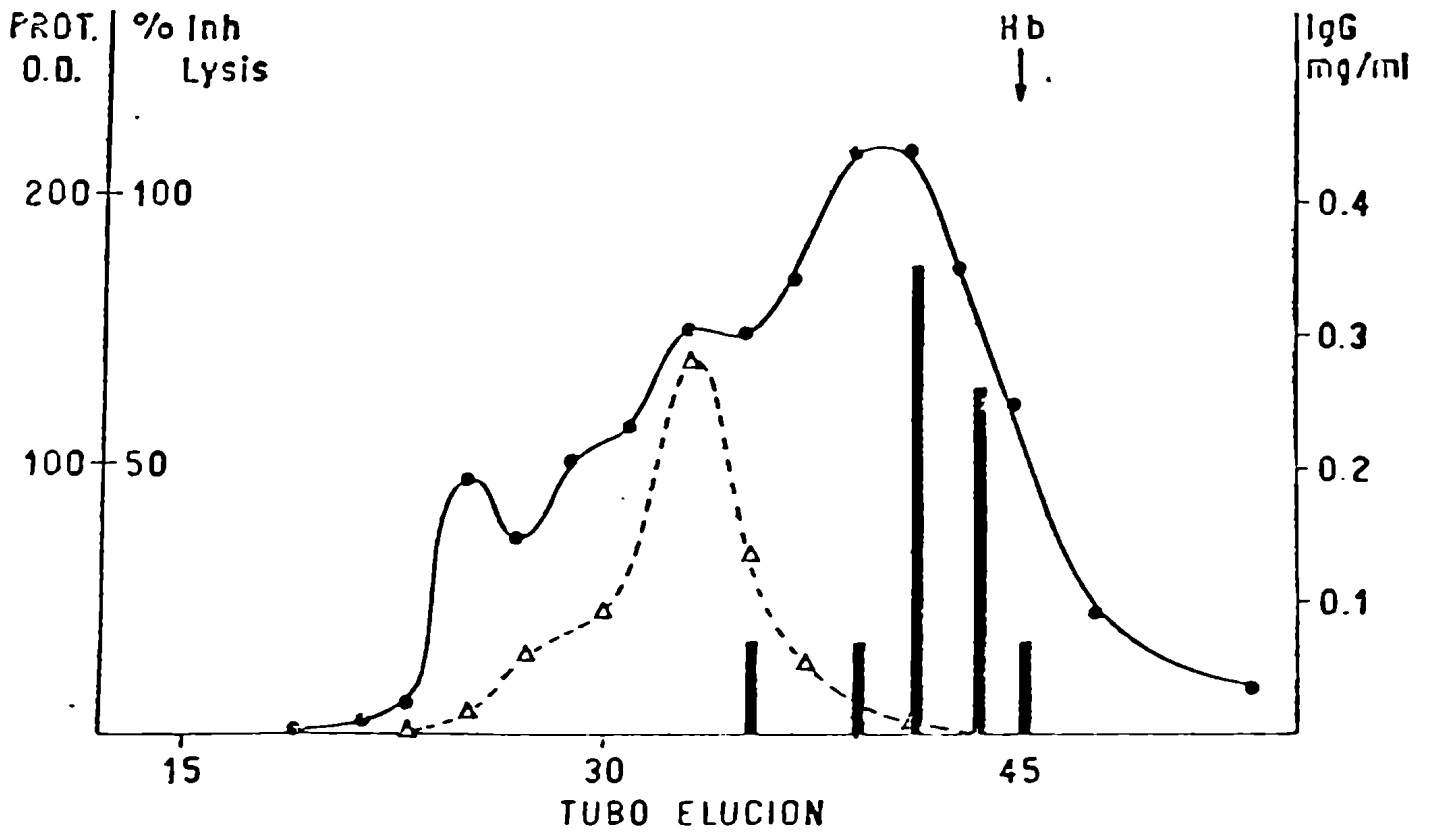
Se incubó suero de cobayo FHA ó suero normal de cobayo (Scob N), calentados (56°C, 30 min) y sin calentar, con suero humano normal (SHN). Se determinó el nivel hemolítico total (CH50) y C4 en comparación con el mismo suero indicador incubado en ausencia de Scob FHA.

FIGURA 10



Incubación de las fracciones sobrenadante y precipitado de la centrifugación a 82 000 x g con SHN en comparación con el Scob FHA sin centrifugar. Se demuestra que el factor activante del sistema complemento permanece en el sobrenadante.

FIGURA 11



— Proteina D. O. 500 m (44)
 - - - Ig G mg/ml (38)
 ■ % de inhibición de CH50

TABLA 5

Efecto de agentes quelantes sobre la actividad
inhibitoria de Scob FHA

SHM. incubado con	CH50 (u/ml)			C4 (SFU/ml)		
	Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺	EGTA	EDTA	Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺	EGTA	EDTA
Scob FHA	75	169	187	650	3070	3330
VBS	127	146	153	1760	2950	3613

La incubación se llevó a cabo como en los otros experimentos con ó sin 0,01 M EGTA ó EDTA segun el caso, con el agregado de iones Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ al terminar la incubación. Luego se tituló la actividad residual.

TABLA 6

Necesidad de la integridad de C1 en el suero indicador para la
inactivación de C4 por el Scob FHA

Reacción con:	SHN	SHN, 56°C	SH ClrD
Scob FHA	1060 ^x	2710	35000
VBS	5150	2470	33000

x : SFU/ml , C4:

El suero humano normal se hizo deficiente en C1 por calentamiento a 56°C 30 minutos e se empleó suero de un individuo congénitamente deficiente en Clr.

TABLA 7

Efecto de la incubación de enzimas lisosomales de PMN cobayo sobre la actividad hemolítica de SHN y Scob N

Reacción 1 hora	SHN		Scob N	
	CH50 u/ml	C4 SFU/ml	CH50	C4
E L cob 1/2	14	54000	193	37000
1/4	17	63000	217	43000
1/8	26	65000	250	48000
1/16	48	70000	258	49000
VBS	61	84000	265	54000

Se procedió igual que en los otros experimentos, reemplazando el Scob FHA por enzimas lisosomales de leucocitos polimorfonucleares de cobayo (E L cob).

TABLA 8

Efecto de agentes quelantes sobre la actividad inhibitoria de
enzimas lisosomales de PMN cobayo

Reacción con:	CH50 (u/ml)		
	Ca ⁺⁺ Mg ⁺⁺	EGTA	EDTA
Enz.lis. cobayo	65	134	130
VBS	131	146	153

Las mismas especificaciones que para la tabla 5, reemplazando Scob FHA por E L cob al igual que en la tabla 7.

CAPITULO VIII

**Alteraciones del sistema complemento
y la respuesta humoral anti-virus
Junín en la fiebre hemorrágica argen-
tina**

En la patogenia de diversas enfermedades virales se ha demostrado la participación del sistema C. En el modelo experimental de FHA en el cobayo se demostró una activación conjunta de los sistemas C y coagulación (21,55). La activación de C en los cobayos involucra la vía clásica (27) como se demostró en el capítulo V de esta tesis.

En la enfermedad humana los anticuerpos antiviral Junín se detectan generalmente 4 a 6 semanas de establecidos los síntomas; esto es relativamente tarde en el período de convalecencia de la enfermedad (50). Se ha mencionado también una posible participación de mecanismos inmunopatológicos en la FHA (56).

En este capítulo se presentarán los resultados de la investigación efectuados sobre la participación del sistema C en la patogénesis de la FHA. Este problema se encaró realizando el estudio secuencial de las alteraciones del sistema C y su correlación con las diferentes formas clínicas de la enfermedad y con la aparición de anticuerpos antiviral Junín detectados por la técnica de inmunofluorescencia. Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el equipo del Dr. Arana (10).

Se estudió el nivel hemolítico de C y de los componentes C⁴ y C² y la concentración protéica de los componentes de la vía clásica C_{1q}, C_{1r}, C_{1s}, C⁴, C₃, C⁵, factor B de la vía alternativa, el inhibidor de C₁ y el inactivador de C_{3b} (C_{3b} INA) en 19 pacientes con FHA. El cuadro clínico de la enfermedad fué grave en 5 casos (FHA-G), moderado en 5 (FHA-M) y leve en 9 (FHA-L) (cuadro 4). El diagnóstico, clasificación de los pacientes y fecha de iniciación de la enfermedad se realizó con criterios clínicos, de laboratorio y epidemiológicos. Se obtuvieron por lo menos tres muestras de cada paciente entre el día 7^o y 16^o de evolución y luego de 1 y 2 meses de comenzada la sintomatología.

El nivel total de complemento y el título hemolítico de C² se determinaron con técnicas funcionales y los componentes C_{1q}, C⁴, C₃ y C⁵ se valoraron por inmunodifusión radial expresando los resultados en unidades porcentuales con respecto a un pool de suero humano normal.

En las muestras de los días 9 y 11 correspondientes a los pacientes con FHA-G y FHA-M se observaron descensos del nivel hemolítico total, C² y de la concentración protéica de C₃ y C⁵ que oscilaron entre 20 y 60 % de los controles. Luego de dos semanas de evolución, las ci-

fras se normalizaron o dieron valores superiores a la media normal. En cambio los pacientes con FHA-L presentaron valores normales del C total con descenso moderado de C2, C3, y C5 (tabla 9 y 10). En los pacientes de los grupos con FHA-M y FHA-G la evolución de los niveles de C4 mostró una tendencia inversa a CH50 y C3 observándose valores elevados en las muestras iniciales. En los sueros de pacientes con FHA-G se comprobó la presencia de productos de degradación de C3 y del factor B de la vía alternativa durante la fase aguda de la enfermedad (figura 12). Se investigó la presencia de complejos inmunes solubles con la técnica de fijación de Clq radioactivo. Se demostró material reactivo con Clq en solo cuatro sueros de los 19 pacientes investigados. La presencia de este material no tuvo ninguna correlación aparente con otros parámetros clínicos ni con el estadio evolutivo de la enfermedad, apareciendo en tres de los pacientes en el período de recuperación clínica y de laboratorio.

La característica sobresaliente del perfil de los componentes de C estudiados en los pacientes con FHA moderada o grave en etapa aguda fué la alteración de la relación C3/C4 (FHA 0.47; normal 0.8-1.2). Esto es diferente a lo observado en la mayoría de los cobayos experimental-

mente infectados con virus Junín. Si bien el mecanismo en juego no es claro estos resultados contrastan con los descritos en otras fiebres hemorrágicas virales como el dengue asiático (consumo por complejos inmunes) (figuras 13, 14 y 15) y (tabla 11).

Se tituló hemolíticamente al componente C₄ y como se detalla en la tabla 12 se encontró una ineficiencia hemolítica semejante a la demostrada en los cobayos infectados con virus Junín.

Entre los días 12^o y 17^o después de la aparición de los primeros síntomas, casi todos los pacientes que sobreviven presentan anticuerpos antiviral Junín detectados por inmunofluorescencia coincidentemente con el comienzo de la mejoría clínica (tabla 13). La figura 16 muestra la imagen de inmunofluorescencia obtenida con células BHK/21, infectadas con virus Junín en la que se aprecia el citoplasma cargado de nódulos fluorescentes que le dan un aspecto característico.

CUADRO 4

DATOS CLINICOS Y DE LABORATORIO EN PACIENTES CON FHA

<u>ESTADIO</u>	<u>DIAS DE EVOLUCION</u>
Agudo temprano	hasta día 11 ^º
Agudo tardío	12 ^º a 20 ^º
Convalecencia	21 ^º a 60 ^º

<u>Grados</u>	<u>Observaciones</u>
severo o grave	- plaquetas 50000/mm ³ leucocitos 1400/mm ³ proteínuria 3 gr/l confusión mental, ataxia severa, convulsiones.
moderado	- plaquetas 50000-80000/mm ³ leucocitos 1500-2500/mm ³ proteínuria 1gr/l a 3 gr/l ataxia moderada, temblor de lengua
leve	- Trombocitopenia, leucopenia proteínuria 1gr/l o ausente, sin compromiso neurológico o poco temblor de lengua

ESTUDIOS DE COMPLEMENTO EN PACIENTES CON FIA DURANTE EL PERIODO AGUDO TEMPORARIO^x

TABLA 9

Grado de la enfermedad	n	Cl50 u/ml	Clq %	Clr %	Cl3 %	C2 SFU/ml	C3 %	C5 %	D %	Cl inh %	C3 inh %	
severa	4	137* + - 15	67 +15 -15	150 +60 -60	97 +6 -6	168* +27 -27	120* +27 -27	64° +9 -9	47* +5 -5	107 +11 -11	97 +24 -24	75 +3 -3
moderada	5	105 +25 -25	98 +16 -16	112 +15 -15	122 +33 -33	157 +15 -15	375* +77 -77	62° +9 -9	72* +15 -15	118 +22 -22	144 +25 -25	69 +5 -5
leve	8-9	212 +6 -6	113 +11 -11	101 +12 -12	116 +15 -15	116 +12 -12	695° +139 -139	75° +6 -6	75* +7 -7	87 +9 -9	120 +19 -19	79 +11 -11
normales	10-14	227 +6 -6	91 +6 -6	101 +3 -3	90 +9 -9	103 +5 -5	1042 +69 -69	98 +4 -4	99 +7 -7	81 +6 -6	86 +5 -5	96 +11 -11

^x Los sueros se obtuvieron de pacientes con FIA en los días 6-11 de evolución. Fueron procesados por inmunodifusión radial (Clq, Clr, Cl3, C4, C3, C5, D, Cl inh y C3 inh) y por técnicas hemolíticas (Cl50, C2). Los resultados de la inmunodifusión radial se expresan como la media de las medidas porcentuales.

* p < 0.001

° p < 0.01

⊙ p < 0.05

TABLA 10

Nivel de Complemento en FHA humana (días 6º - 11º de evolución)

(resumen)

Grado de la enfermedad	n	CH50 v/ml	C4 %N	C3 %N	C5 %N
severo	4	137 [±] 15 [★]	169 [±] 27 [*]	64 [±] 9 [■]	47 [±] 5 [★]
moderado	5	185 [±] 25	157 [±] 15	62 [±] 9 [■]	72 [±] 15 [★]
leve	8-9	212 [±] 26	116 [±] 12	75 [±] 6 [*]	75 [±] 7 [*]
normales	10-12	227 [±] 6	103 [±] 5	98 [±] 4	99 [±] 7

★ p < 0,001

■ p < 0,01

* p < 0,05

FIGURA 12

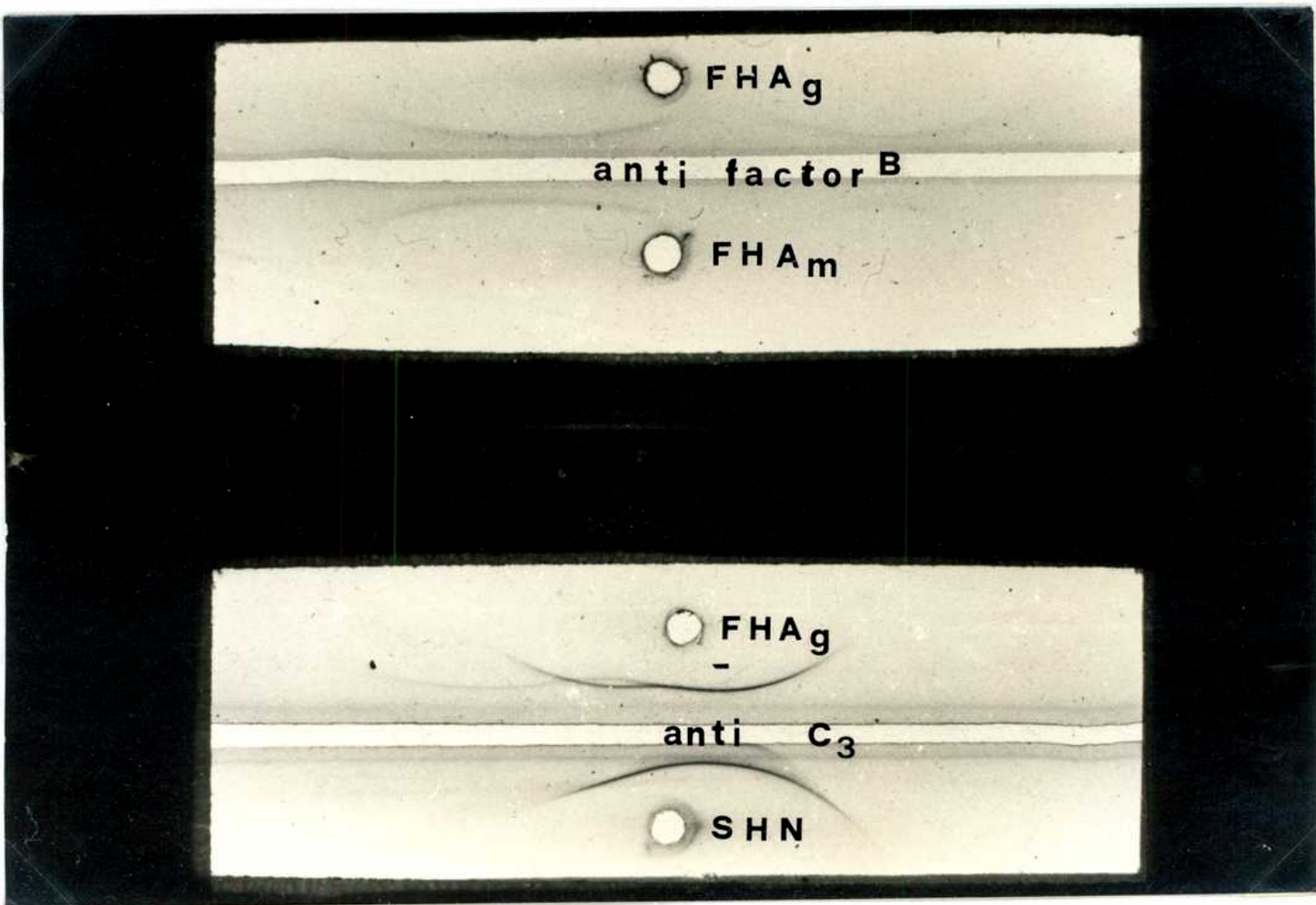


TABLA 11

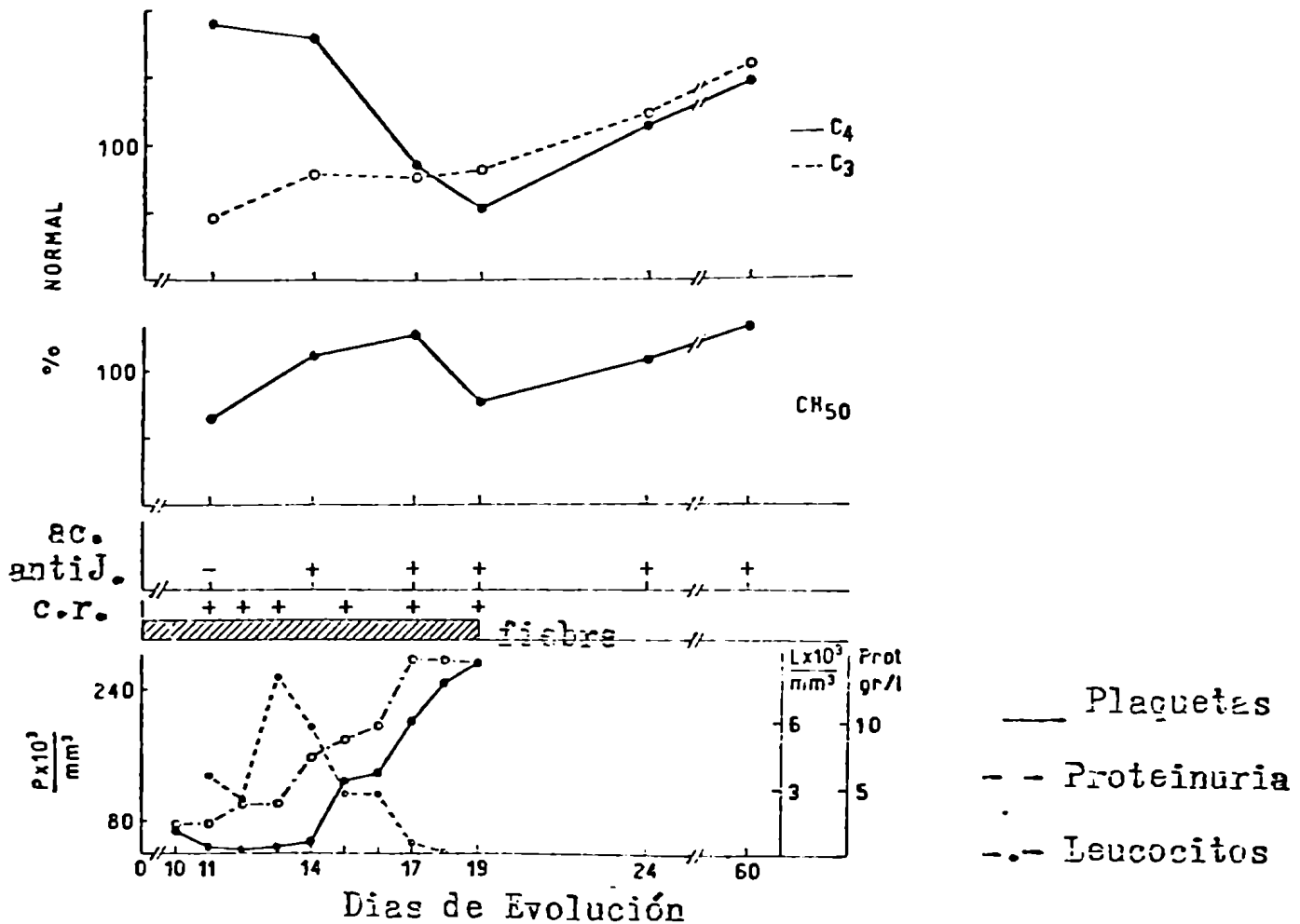
Relación C3/C4 en sueros de pacientes con FHA en el período agudo temprano.

Grado de la enfermedad	n	C3/C4	
		media	\pm ES
severo	4	0,36	\pm 0,005 x
moderado	5	0,46	\pm 0,12 x
leve	9	0,70	\pm 0,09 x
normales	16	1,17	\pm 0,08

x $p < 0,001$

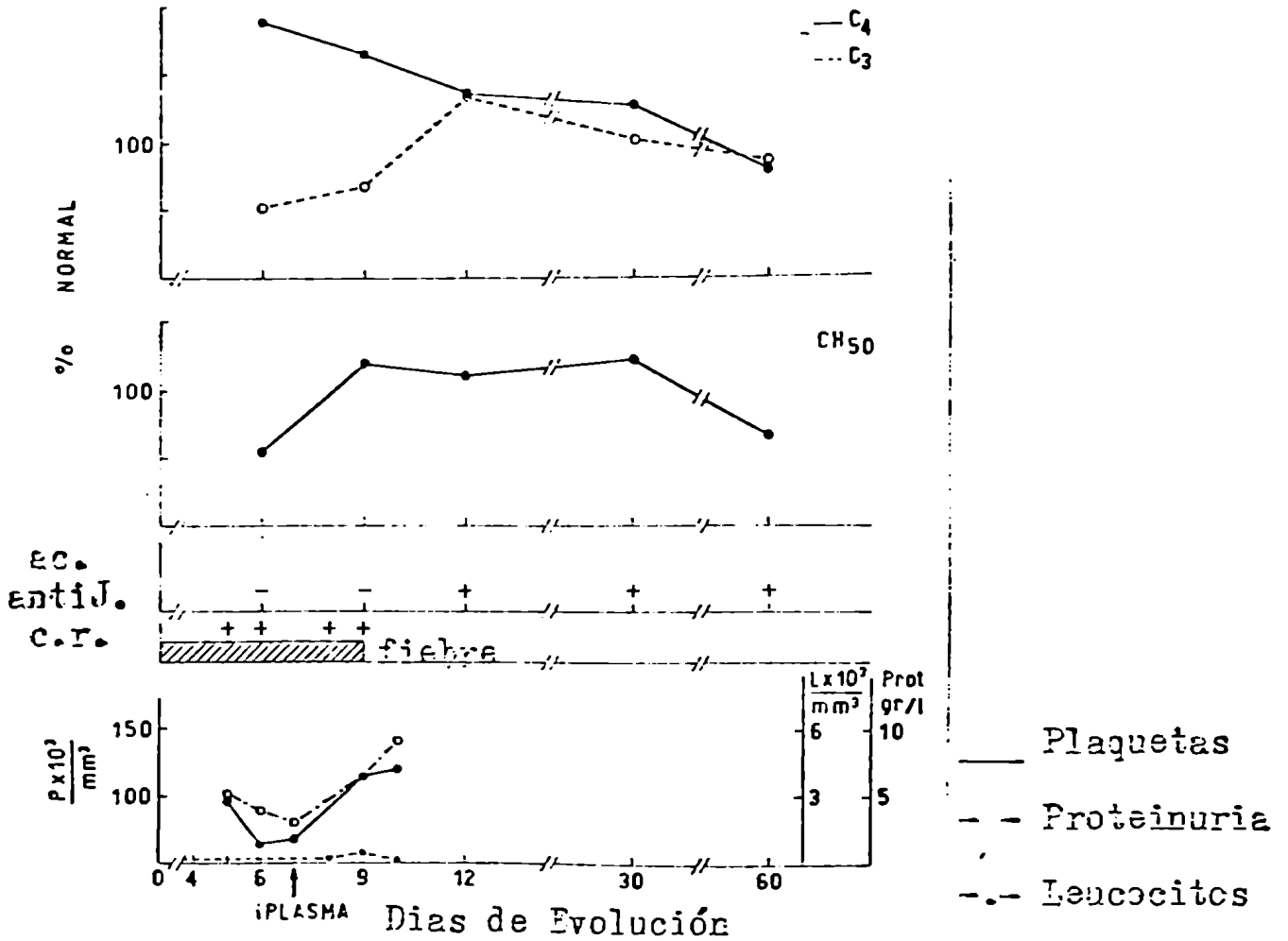
La relación de la concentración de C3 a C4 medida por inmunodifusión radial se realizó individualmente en las muestras de pacientes con FHA obtenidos entre los días 6-11 de evolución. Se consig-
nan las medias \pm el error standard

FIGURA 13



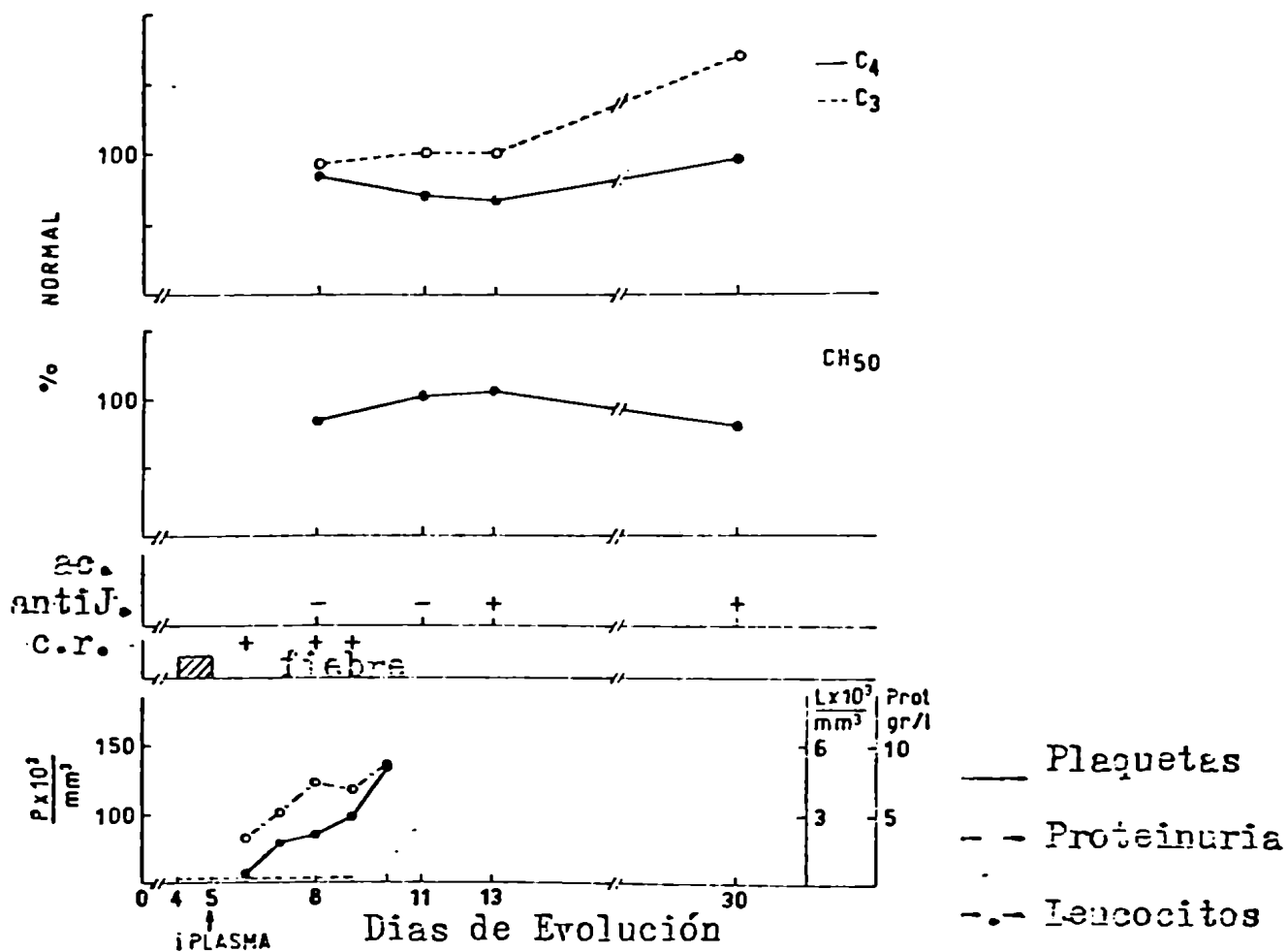
Perfil evolutivo de C3 y C4 en un paciente con FHA grave : valoración de C3 y C4 por inmunodifusión radial. Resultados expresados como porcentajes de un pool de sueros normales.
 CH50 : nivel total de C hemolítico
 ac. antiJ. : anticuerpos anti-virus Junín medidos por inmunofluorescencia..
 c.r. : células redondas en orina.

FIGURA 14



Perfil evolutivo de C3 y C4 en un paciente con FHA moderada (símbolos y abreviaciones igual que en la figura 13)
 iPLASMA : inyección de 250 cc de plasma inmune (no altera ninguno de los parámetros medidos)

FIGURA 15



Perfil evolutivo de C3 y C4 en un paciente con FHA leve (símbolos y abreviaturas igual que en la figura 14).

TABLA 12`

Relación C4 hemolítico a C4 antígeno en el suero de pacientes con FHA en el período agudo temprano.

Grado de la enfermedad	C4H/C4 IDR $\bar{x} \pm ES$	Pacientes con C4H/C4Ag < 0,65
Severo	0,60 \pm 0,13	3/4
moderado	0,54 \pm 0,13	3/4
leve	0,89 \pm 0,07	0/4

$\bar{x} \pm ES$ Valores medios \pm error standart de la relación del título hemolítico expresado en unidades porcentuales a la concentración de C4 medida inmunológicamente (C4H/C4 IDR) fue calculado para cada muestra de suero FHA obtenida en el período agudo temprano.

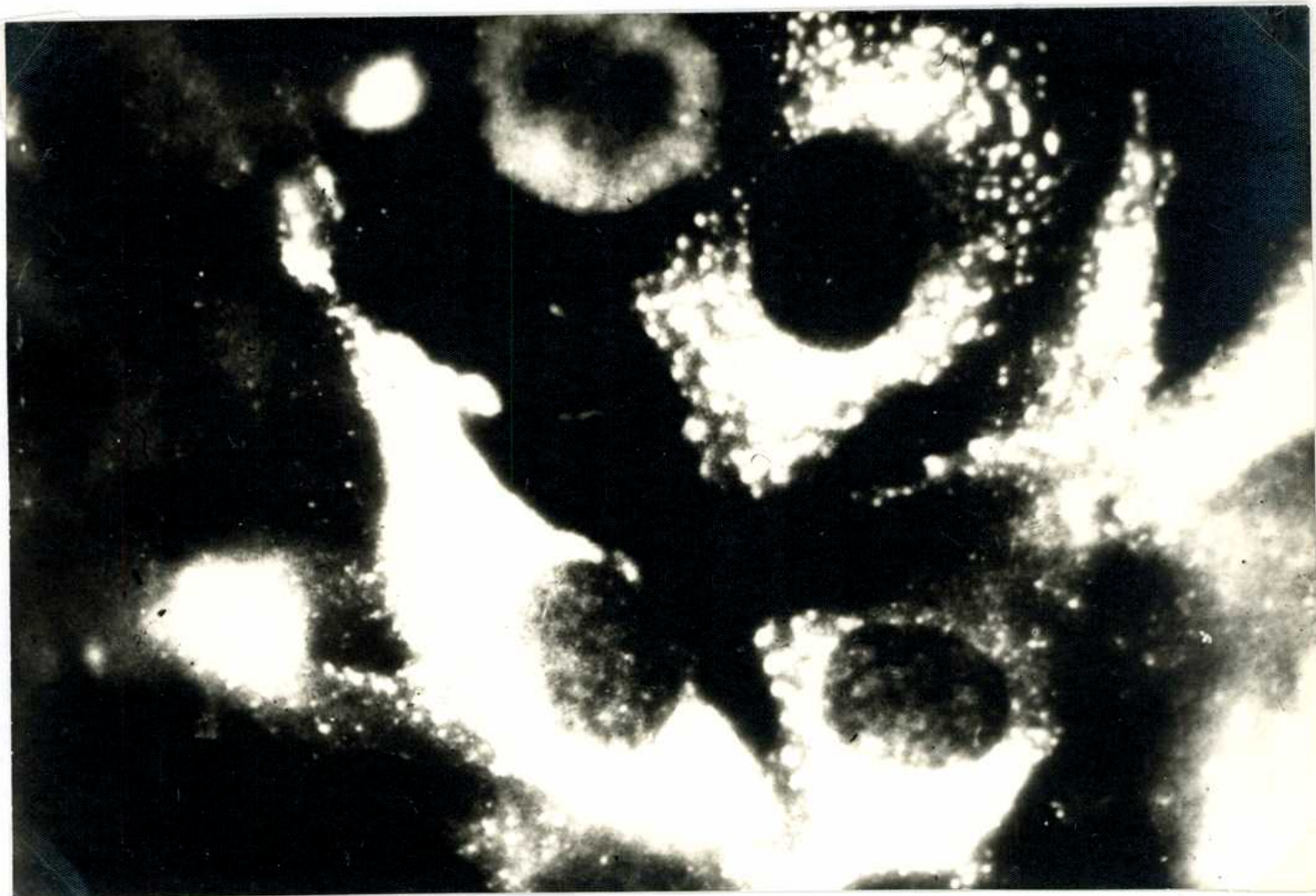
$\frac{a}{b}$ El número de pacientes con el C4H/C4 IDR < 0,65 está dado en el numerador y el número de pacientes estudiados en el denominador.

TABLA 13

DIAS DE EVOLUCION

paciente //	6	7	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
AD																
P1	59	57	75	66	81	81	101			166						
LE	1,5	2,5	2,4	2,3	2,3	4,1	6,2			0,5						
AD																
P1						61	67	115	162	201	276					
LE						2,5	3,0	3,0	3,9	4,9	4,7					
AD																
P1					61	41	42	47	50	128	134	202	216	273		
LE					1,3	1,4	2,3	2,4	4,4	5,2	5,9	9	9	8,5		
AD																
P1					91	122	119	119	145	226	259					
LE					2,6	2,7	2,5	2,1	3	3,8	4,9					
AD																
P1				54	60	56	69	106	173	250						
LE				1,8	3,0	3,1	3,1	3,1	4,8	4,3						
AD																
P1									64	58		68	111	134		
LE									3,0	4,4		5,4	5,5	5,7		
AD																
P1				69	66	58	49	51	54	70	114	238				
LE				2,6	2,4	2,1	2,7	2,5	2,1	2,9	4,3	5,4				
AD																
P1				64	68	58	71	105	147	194						
LE				2,2	2,0	2,6	3,3	3,0	3,0	3,0						
AD																
P1	64	67		112	120											
LE	2,2	1,8		3,7	5,7											
AD																
P1			108	88	68	63	82		110	117			218			
LE			1,4	1,4	1,6	1,7	2,0		4,5	3,8			4,3			
AD																
P1	53	78	83	97	130											
LE	2	3,1	4,4	4	4,9											
AD																
P1		84		81	102	119										
LE		2		2,4	2,5	4,9										
AD																
P1				110	111	75	75	72	49	95	86	156	157	207		
LE				2,1	1,9	1,8	1,8	1,4	3,2	3,4	3	4	4	4,5		
AD																
P1	115	125														
LE	2,0	4,0														
AD																
P1				63	88	88	93									
LE				2,3	2,9	4,4	4,4									
AD																
P1				79	98											
LE				1,3	3,7											
AD																
P1								76								
LE								1,0								
AD																
P1								114	103	104		157	171	209		
LE								1,9	2,6	2,9		3,4	4,7	3,4		
AD																
P1	81	93		111	140											
LE	1,8	3		3,8	3,8											

• muerte AB: anticuerpos inmunofluorescentes P1: recuento plaquetas x10³/mm³
 LE: recuento leucocitos x10³/mm³
 + material reactivo con Clq marcado + positivo - negativo



Inmunofluorescencia indirecta de células BHK/21 (riñón de hamster recién nacido) infectadas con virus Junín.

Aumento original X 640.

Las células fueron tratadas con suero de un paciente con fiebre hemorrágica argentina (17 días después del comienzo de los síntomas). Luego fueron incubadas con un suero anti-gamma globulina humana marcada con fluoresceína.

Se obtuvo una imagen positiva, con nódulos citoplasmáticos de fluorescencia específica.

CAPITULO IX

Discusión y conclusiones

Los resultados presentados en esta tesis indican que la disminución de la actividad hemolítica observada en cobayos infectados experimentalmente con virus Junín (FHA exp) (26) ocurre por activación de la vía clásica del sistema complemento (C).

El perfil de C de los cobayos infectados recuerda al modelo observado en la fiebre hemorrágica asiática (dengue) (45) pero con un mayor descenso del título de C₄. Sin embargo, en el dengue, la activación ocurre después de infecciones a repetición cuando están presentes altos títulos de anticuerpos contra el antígeno viral. En la FHA exp, por el contrario, los descensos en la actividad del C ocurren en ausencia de anticuerpos anti virus detectables (16).

Las alteraciones de la hemostasia observadas en el modelo experimental de FHA suceden en el mismo período que los cambios observados en el sistema C, aunque quizás el descenso de la plaquetas sea la manifestación más precoz (21). Esto resulta interesante ya que en los últimos tiempos se ha dado gran importancia a la interdependencia de los sistemas de "fase aguda" de la ⁿsangre, principalmente el complemento, kininas y fibrinólisis (51). Existe evidencia sustancial que la ac-

tivación de uno de estos sistemas puede gatillar las otras respuestas (51). Los complejos inmunes pueden producir una activación masiva de los sistemas coagulación y C en la FHA. Sin embargo fué imposible detectar complejos inmunes en este modelo, en el que se ha observado una depresión del sistema inmune (16).

La presencia de grandes cantidades de enzimas proteolíticas (23), proteínas catiónicas(52) o un efecto directo del virus sobre el sistema C puede producir resultados similares. En base a este concepto se planteó estudiar qué mecanismos podían provocar "in vitro" efectos similares. Los estudios descartan la participación de complejos inmunes circulantes solubles o agregados de alto peso molecular. Los resultados obtenidos con las mezclas del suero de cobayos infectados y suero humano normal y de cobayo normal son análogos a los obtenidos por acción de extractos lisosomales de leucocitos normales y sugieren la activación del sistema C en la FHA exp. puede ser secundaria a la liberación de enzimas leucocitarias documentada previamente en este modelo (23). En los cobayos infectados con virus Junín se observó también una disminución de la eficiencia hemolítica de C_4 con relativa acumulación de una for-

ma inactiva de este componente, de movilidad electroforética alterada. Esto sugiere una activa producción de fragmentos de degradación, lo que coincide con las evidencias de activación a través de la vía clásica presentada más arriba.

Puede ser posible que ambas activaciones del complemento y coagulación sean manifestaciones secundarias de la infección viral pero la consecuencia de las mismas juega un importante papel en la severidad de la enfermedad (50).

La segunda parte de la tesis comprende el estudio de la activación de C en los pacientes con FHA. Esto se encaró analizando los posibles mecanismos de consumo en relación con las características clínicas de los pacientes y con la respuesta inmune anti-virus Junín.

Nuestros resultados no concuerdan con el concepto corriente de que la respuesta antiviral en FHA es detectada en el período convalescente tardío con un retraso de 4 a 6 semanas de establecidos los síntomas (48).

Los resultados presentados en el capítulo VIII demuestran que los anticuerpos medidos con técnicas de inmunofluorescencia aparecen en

un número significativo de casos no fatales entre los días 12 y 17 de evolución. Dichos anticuerpos son también capaces de fijar complemento. En este período se hace evidente la recuperación clínica y de laboratorio de los pacientes. La aparición de los anticuerpos coincidente con la recuperación clínica puede ser una consecuencia del pasaje de la relación antígeno/anticuerpo a la zona de exceso de anticuerpos. Si esto fuera así, se podría postular la participación de los complejos inmunes en un período temprano de la enfermedad.

Un mecanismo patológico de esta clase fué propuesto para la fiebre hemorrágica asiática (dengue), una enfermedad viral en donde la activación de ambas vías del sistema C está muy relacionada con la presencia de complejos inmunes circulantes (45,49). Sin embargo nuestros estudios del perfil de los componentes del complemento en FHA dan resultados que no parecen ser compatibles con una activación del sistema C por la vía clásica, iniciada por complejos inmunes.

El perfil de activación del C de los pacientes con FHA severa y moderada está caracterizado por una disminución de C3 y C5 con la aparición de productos de degradación de C3 y factor B.

En las mismas muestras del período agudo temprano la eficiencia hemolítica del componente C4 fué menor que la de los pacientes con FHA leve, aunque no alcanzó un nivel tan bajo como en el modelo experimental (28 y capítulo VII de esta tesis).

La búsqueda de complejos inmunes, realizada con el procedimiento que se basa en la capacidad de fijar Clq radiactivo dio datos negativos en 15/19 pacientes. En dos de los cuatro casos positivos, el material reactivo con Clq apareció junto con los anticuerpos antiviral Junín en el momento de recuperación clínica y de laboratorio. Esto sugiere que si se forman complejos inmunes, solo están presentes durante un corto período de tiempo y no juegan un rol importante en la patogénesis de la FHA. Esto es compatible con la ausencia de inmunoglobulinas y C3 unidas "in vivo" a los glómerulos y estructuras vasculares de los casos fatales de FHA (14, 15).

En la FHA humana la activación de la vía clásica del complemento es muy difícil de evaluar debido a la alta concentración del componente C4. Por otra parte a pesar de que los niveles de Clq están bajos en algunos pacientes, la media de Clq, C1r y C1s en el período agudo

temprano no difiere significativamente de los normales. Cabe agregar que la persistencia de productos de conversión de C3 y factor B en circulación así como la presencia de C4 no funcional, indicaría una saturación o disfunción del sistema de degradación normal en la fase aguda.

Las alteraciones del complemento presentadas en esta tesis son evidentes en la fase aguda temprana en los pacientes con FHA severa y moderada, y ocurre antes del día 13 de evolución de la enfermedad. El momento de iniciación de estos cambios no pudo establecerse pues las muestras más tempranas obtenidas ya presentaban el nivel hemolítico total disminuido y cambios en la relación C3/C4.

La activación del sistema C ha sido demostrada en gran variedad de condiciones clínicas caracterizadas por desórdenes de la hemostasia (45, 53, 54). En la FHA (6,11) no fué posible hasta ahora establecer una relación causa- efecto entre los mecanismos de activación de la coagulación y complemento, aunque en el modelo experimental en cobayo la trombocitopenia precede a la activación del C y de los factores de la coagulación sanguínea. Las alteraciones concomitantes de ambos sistemas aparecen más tardíamente, en ausencia de coagulación intravascular

iseminada (21).

El estudio del sistema complemento en la Fiebre Hemorrágica Argentina abre una brecha en la interpretación de la inmunopatología de las fiebres hemorrágicas causadas por arenavirus. La posibilidad de que el sistema complemento pueda cooperar con los anticuerpos específicos en el control de la infección debe ser evaluada. Sin embargo en base a los resultados discutidos más arriba es razonable considerar que la activación del sistema complemento puede contribuir a algunos eventos patológicos de la/FHA, en particular contribuyendo al desarrollo del síndrome de shock.

*

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. -MARTINES PINTOS, I.F. (1962)
EPIDEMIOLOGIA DEL MAL DE LOS RASTROJOS
AN. COM. INVEST. CIENT. 3:9-102
2. -ARRIBALZAGA, R.A (1955)
UNA NUEVA ENFERMEDAD EPIDEMICA A GERMEN DESCONOCIDO, HIPERTERMIA
NEFROTICA, LEUCOPENICA Y ENANTEMATICO
DIA MED. 27:1204-1210
3. -PARODI, A.S.; GREENWAY, D.J.; RUGGIERO H. y COL. (1958)
SOBRE LA ETIOLOGIA DEL BROTE EPIDEMICO DE JUNIN
DIA MED. 30:2300-2302
4. -ROWE, W.P.; MURPHY, F.A.; BERGOLD, G.H. ET AL. (1970)
ARENORVIRUSES. PROPOSED NAME FOR A NEWLY DEFINED VIRUS GROUP
J.VIROL. 5:651-652
5. -SABATTINI, M.S. Y MAIZTEGUI, J.I. (1970)
FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA
MEDICINA, Bs.AIRES 30:8-15
6. -SCHWARZ, E.; MANDO, O.G.; MAIZTEGUI, J.I. Y COL. (1972)
ALTERACIONES DE LA COAGULACION EN LA FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA
MEDICINA 32: 247-259
7. -DE BRACCO, M.M.E.; RIMOLDI, M.T.; MAIZTEGUI, J.I. y COL. (1976)
ALTERACIONES DEL SISTEMA COMPLEMENTO EN LA FIEBRE HEMORRAGICA AR-
GENTINA
MEDICINA 36: 619
8. -COSSIO, P.M.; DE BRACCO, M.M.E.; RABINOVICH, A. y COL. (1977)
ANTICUERPOS ANTI-VIRUS JUNIN Y MATERIAL REACTIVO CON Clq EN LA FHA
ACTA FIS.LAT.; EN PRENSA
9. -DE BRACCO, M.M.E.; RIMOLDI, M.T.; MAIZTEGUI, J.I. ET AL. (1977)
ACTIVATION OF COMPLEMENT IN ARGENTINE HEMORRHAGIC FEVER (AHF)
FED.PROC. 36:1265
10. -DE BRACCO, M.M.E.; RIMOLDI, M.T.; COSSIO, P.M. ET AL. (1978)
ALTERATIONS OF THE COMPLEMENT SYSTEM AND ANTI-JUNIN VIRUS HUMORAL
RESPONCE
N.ENGL.J.MED. 299:216

11. -MOLINAS, F.; DE BRACCO, M.M.E.; RIMOLDI, M.T. Y COL. (1977)
ESTUDIO DE LA HEMOSTASIA EN LA FFA
SIN PUBLICAR
12. -GALLARDO, F. (1970)
FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA. HALLAZGOS ANATOMOPATOLOGICOS EN 10
NECROPSIAS
MEDICINA. Bs. AIRES 30 (SUPPL 1):77-84
13. -ELSNER, B.; SCHWARZ, E.; MANDO, O. ET AL (1973)
PATHOLOGY OF 12 FATAL CASES OF ARGENTINE HEMORRHAGIC FEVER
AM. J. TROP. MED. HYG. 22: 229-236
14. -COSSIO, P.M.; LAGUENS, R.P.; ARANA, R.M. ET AL. (1975)
ULTRASTRUCTURAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE HUMAN KID-
NEY IN ARGENTINE HEMORRHAGIC FEVER
VIRCHOWS ARCH A. PATH. ANAT. AND HISTOL. 368:1-9
15. -MAIZTEGUI, J.I.; LAGUENS, R.P.; COSSIO, P.M. ET AL. (1975)
ULTRASTRUCTURAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES IN 5 PATIENS
WITH ARGENTINE HEMORRHAGIC FEVER
J. INFECT. DIS 132:35-43
16. -COTO, CELIA (1974)
JUNIN VIRUS
PROGRESS IN MED. VIR. 18:127
17. -BOXACA, M.; PARODI, A.S.; RUGGIERO H. Y COL. (1961)
FIEBRE HEMORRAGICA EXPERIMENTAL EN EL COBAYO (VIRUS JUNIN)
REV. SOC. ARGENT. BIOL. 37:170-179
18. -ELSNER, B.; BOXACA, M.C.; WEISSENBACHER, M. Y COL (1976)
ESTUDIO DE LA INFECCION EXPERIMENTAL DEL COBAYO CON VIRUS JUNIN
I. ANATOMIA PATOLOGICA
MEDICINA, Bs. AIRES 36:197-206
19. -CARBALLAL, G.; RODRIGUEZ, M.; FRIGERIO, M.J. ET AL. (1977)
JUNIN VIRUS INFECTION OF GUINEA PIGS. ELECTRON MICROSCOPIC STU-
DIES OF PERIPHERAL BLOOD AND BONE MARROW
J. INFECTIOUS DISEASES 135:367-373
20. -GUERRERO, L.B. DE; BOXACA, M. Y PARODI, A.S. (1965)
FIEBRE HEMORRAGICA EXPERIMENTAL EN COBAYOS (VIRUS JUNIN). CON-
TAGIO Y ELIMINACION DE VIRUS
REV. ASOC. MED. ARGENT. 79:271-273

21. -MOLINAS, F.C.; PAZ, R.A.; RIMOLDI, M.T. ET AL. (JUNIO 1978)
STUDIES OF BLOOD COAGULATION AND PATHOLOGY IN EXPERIMENTAL INFECTION OF GUINEA PIGS WITH JUNIN VIRUS
J.INF.DIS. 137:740-746

22. -GUERRERO, L.B.DE; BOXACA, M.C.; WEISSENBACHEN, M. Y COL. (1977)
ESTUDIO DE LA INFECCION EXPERIMENTAL DEL COBAYO CON VIRUS JUNIN II. CUADRO CLINICO, DISEMINACION Y ELIMINACION DEL VIRUS
MEDICINA, EN PRENSA

23. -KIERSZEMBAUM, F.; BUDZKO, D.B. AND PARODI, A.S. (1970)
ALTERATIONS IN THE ENZYMIC ACTIVITY OF PLASMA OF GUINEA-PIGS INFECTED WITH JUNIN VIRUS
ARCH.GES.VIRUSFORSCH 30:217-223

24. -HELP, G. (1968)
ALTERACION DE LOS LIPIDOS EN EL SUERO DE COBAYOS INFECTADOS CON VIRUS JUNIN (FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA)
REV.SOC.ARGENT.BIOL. 44:28-37

25. -BUDZKO, D.B. (1965)
ELECTROFORESIS DE LAS PROTEINAS SERICAS DE COBAYOS INOCULADOS CON VIRUS JUNIN (EN PAPEL Y GEL DE POLIACRILAMIDA)
REV.SOC.ARGENT.BIOL. 41:92-101

26. - BUDZKO, D.B.; ACOBETTRO, R.I. (1973)
ALTERACIONES DEL NIVEL COMPLEMENTO SERICO EN LA INFECCION EXPERIMENTAL CON VIRUS JUNIN
MEDICINA 33:659

27. -BUDZKO, D.B.; RIMOLDI, M.T.; ACOBETTRO, R.I. Y COL. (1975)
MECANISMO DE ACTIVACION DEL COMPLEMENTO SERICO EN LA FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA EXPERIMENTAL EN EL COBAYO
MEDICINA, BS.AIRES 35:588-589

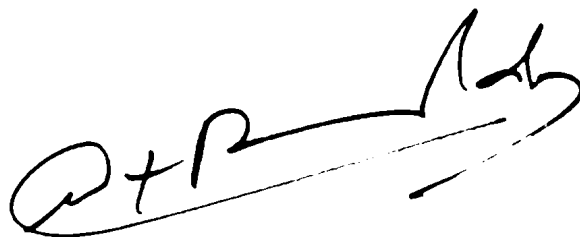
28. -RIMOLDI, M.T.; DE BRACCO, M.M.E. (1976)
INEFICIENCIA HEMOLITICA DE C₄ EN LA FHA EXPERIMENTAL
MEDICINA 36:619-620

29. -FRIGERIO, M.J.; NOTA, N.R.; NEJAMKIS, M.R. Y COL. (1971)
ESTUDIOS INMUNOLOGICOS EN FIEBRE HEMORRAGICA EXPERIMENTAL. I.
INTERVENCION DE UNA CEPA ATENUADA DE VIRUS JUNIN EN LA RESPUESTA INMUNOLOGICA
MEDICINA, Bs.AIRES 31:161-165

30. -PARODI, A.S.; FRIGERIO, M.; NOTA, R.N. Y COL. (1970)
INHIBICION DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA SECUNDARIA EN LA FIEBRE
HEMORRAGICA EXPERIMENTAL(VIRUS JUNIN)
MEDICINA, Bs. AIRES 30:137-140
31. -PARODI, A.S.; GRINSTEIN, S. AND COTO, C.E. (1967)
E. COLI ENDOTOXIN ACTION ON GUINEA-PIGS INFECTED WITH JUNIN VIRUS
(ARGENTINE HEMORRHAGIC FEVER)
REV. LAT. AMER. MICROBIOL. 8:86-91
32. -TAMURA, M.; NELSON, R.A. (1968)
THE PURIFICATION AND REACTIVITY OF THE FIRST COMPONENT OF COMPLE-
MENT FROM GUINEA PIG, HUMAN AND CANINE SERA
J. IMMUNOL. 101:1333
33. -NELSON, R.A.; JENSEN, J.; GIGLI, I. ET AL. (1966)
METHODS FOR THE SEPARATION, PURIFICATION AND MEASUREMENT OF THE
COMPONENTS OF HEMOLYTIC COMPLEMENT IN GP SERUM
IMMUNOCHEMISTRY 3:11
34. -BORSOS, T.; RAPP, H.J.; MAYER, M.M. (1961)
STUDIES ON THE SECOND COMPONENT OF COMPLEMENT I. THE REACTION
BETWEEN EAC₁₄ AND C₂. EVIDENCE ON THE SINGLE SITE MECHANISM OF
..
IMMUNE HEMOLYSIS AND DETERMINATION OF C₂ ON A MOLECULAR BASIS
J. IMMUNOL. 87:310
35. -RUDDY, S.A.; AUSTEN, K.F. (1967)
STOICHIOMETRIC ASSAY OF THE FOURTH COMPONENT OF COMPLEMENT (C₄)
IN WHOLE HUMAN SERUM USING EAC₁ agp AND FUNCTIONALLY PURE
HUMAN SECOND COMPONENT
J. IMMUNOL. 99:1162
36. -MAYER, M.M. (1961)
COMPLEMENT AND COMPLEMENT FIXATION IN E.A.C.C.
THOMAS PUBLISHERS, SPRINGFIELD, III, 133-240
37. -KENT, F. AND FIFE, E.H. (1963)
PRECISE STANDARDIZATION OF REAGENTS FOR COMPLEMENT FIXATION
AM. J. TROP. MED. HYG. 12:103
38. -MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F. (1965)
IMMUNOLOGICAL QUANTITATION OF ANTIGENS BY SINGLE RADIAL
IMMUNODIFFUSION. IMMUNOCHEMISTRY 2:235-254

39. -NILSSON, U.; MULLER-EBERHARD, H. J. (1965)
ISOLATION OF β_{1f} GLOBULIN FROM HUMAN SERUM AND ITS CHARACTERIZATION AS THE FIFTH COMPONENT OF COMPLEMENT
J. EXP. MED. 122:277
40. -SCHEIDEGGER, J. J. (1955)
UNE MICROMETHODE DE L'IMMUNOELECTROPHORESE
INTERNAT. ARCH. ALLERGY APPL. IMMUNOL. 33:11
41. -YONEMASU, K.; STROUD, R. M. (1971)
 C_{1q} : RAPID PURIFICATION METHOD FOR PREPARATION OF MONOSPECIFIC ANTISERA AND FOR BIOCHEMICAL STUDIES
J. IMMUNOL. 106:304
42. -ZUBLER, R. H.; LANGE, G.; LAMBERT, P. H. ET AL (1976)
DETECTION OF IMMUNE COMPLEXES IN UNHEATED SERA BY A MODIFIED ¹²⁵
 ^{125}I C_{1q} BINDING TEST: EFFECT OF HEATING ON THE BINDING OF C_{1q} BY IMMUNE COMPLEXES AND APPLICATION OF THE TEST TO SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS
J. IMMUNOL. 116:232
43. -PLOW, E. F.; EDINGTON, Th. S. (1975)
AN ALTERNATIVE PATHWAY FOR FIBRINOLYSIS CLEAVAGE OF FIBRINOGEN BY LEUKOCYTE PROTEASES AT PHYS. PH
J. CLIN. INVEST. 56:30
44. -MODIFICACION DE LOWRY (1971)
J. BIOL. CHEM. 193:265
45. -BOKISCH, V. A.; TOP, F. H.; RUSSELL, P. K. ET AL. (1973)
THE POTENTIAL PATHOGENIC ROLE OF COMPLEMENT IN DENGUE HEMORRHAGIC SHOCK SYNDROME
M. ENGLAND J. MED. 289:996
46. -BUDZKO, D. B. (1976)
COMUNICACION PERSONAL
47. -JOHNSON, K. M. (1970)
FIEBRE HEMORRAGICAS DE AMERICA DEL SUR
MEDICINA Bs. AIRES 30(SURPE. I):99-110

48. -BOKISCH, V.A. (1974)
THE ROLE OF COMPLEMENT IN SHOCK SYNDROME (DENGUE)
PROGRESS IMMUNOL. 2:VOL 4,151
49. -MEMORANDA (1973)
PATHOGENETIC MECHANISMS IN DENGUE HEMORRHAGIC FEVER; REPORT OF AN
INTERNATIONAL COLLABORATIVE STUDY
BULLETIN WHO 48:117-133
50. -MOLINAS, F.; RIMOLDI, M.T.; DE BRACCO, M.M.E. (1975)
ACTIVACION DE LA COAGULACION EN LA FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA
EXPERIMENTAL
MEDICINA 35:589
51. -BROWN, D.L. (1974)
COMPLEMENT AND COAGULATION
PROGRESS IMMUNOL. 2 VOL 1:191
52. -VENGE, P.; OLSSON, I. (1975)
CATIONIC PROTEIN OF HUMAN GRANULOCYTES. EFFECT ON THE CSYSTEM AND
MEDIATION OF CHEMOLACTIC ACTIVITY
J. IMMUNOL. 115:1505-1508
53. -TONAR, R.H.; KOLCHINS, A. (1972)
COMPLEMENT AND COAGULATION SERUM β_{1c} - β_2 IN DISSEMINATED INTRAVAS-
CULAR COAGULATION
THROMB. DIATH. HEMORRH. 27:389
54. -ARGUELLO, C.; BRACCO, M.M.; SANCHEZ AVALOS, J. (1973) I
ALTERACIONES DEL SISTEMA C Y COAGULACION EN SEPSIS POSABORTO
MEDICINA 33:609

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. T. Rimoldi', written in a cursive style with a horizontal line underneath.

Licenciada María Teresa Rimoldi

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. M. de Bracco', written in a cursive style.

Dra. María Marta de Elizalde de Bracco

AGRADECIMIENTOS

M. M. E. de Bracco, C. Dosne de Pasqualini, J. A. Manni, R. L. Cardoni,
M. A. Isturiz, C. Inglessini, N. E. Riera Cervantes, M. A. Peña.

Agradezco profundamente a las personas citadas su valioso aporte para concretar la realización y presentación de esta Tesis.

AÑO 1978