

Tesis de Posgrado

Consecuencias de la activación de los linfocitos en sus etapas iniciales

Goldstein de Fink, Susana Beatriz

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:

Goldstein de Fink, Susana Beatriz. (1987). Consecuencias de la activación de los linfocitos en sus etapas iniciales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2044_GoldsteindeFink.pdf

Cita tipo Chicago:

Goldstein de Fink, Susana Beatriz. "Consecuencias de la activación de los linfocitos en sus etapas iniciales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2044_GoldsteindeFink.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CONSECUENCIAS DE LA ACTIVACION DE LOS LINFOCITOS
EN SUS ETAPAS INICIALES

AUTORA: SUSANA BEATRIZ GOLDSTEIN DE FINK
DIRECTORA: MARIA MARTA DE ELIZALDE DE BRACCO

Lugar de trabajo:
Sección Inmunología
Instituto de Investigaciones Hematológicas
ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

Tesis presentada para optar al título de:
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
Buenos Aires, 1987

- 2044 -
g.2

AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy especialmente a la Dra María Marta de Elizalde de Bracco por el aporte de su capacidad científica y calidez humana, así como su interés por el mejoramiento de mi formación profesional. Su constante estímulo y apoyo resultaron de inestimable valor.

Agradezco también a mi familia por su paciencia y estímulo permanente, y a mis amigas Dorita, Myriam y Andrea por su incondicional apoyo y aliento.

Quiero agradecer además a mis compañeros de laboratorio que me han acompañado y estimulado durante el desarrollo de este trabajo.

Deseo expresar en particular mi agradecimiento al Dr Martín A. Isturiz por la paciente lectura y revisión de este trabajo, a la Sra Nilda Sotelo por sus excelentes ilustraciones y al Dr Daniel U. Sordelli por su valiosa colaboración en el empleo de la computadora para la escritura de esta tesis.

Quisiera agradecer a la Dra Marta R. Finiasz por el tiempo de trabajo y discusión que compartimos, a la Dra Susana E. Olabuenaga por su generoso apoyo y a la Dra Rita Cardoni por sus

útiles observaciones.

Por otro lado debo manifestar mi gratitud a la Srta Marta E.Felippo y a la Sra Gladys Rojas por su eficaz apoyo técnico, y a la Sra María Esperópolo y a la Srta Evelia López por la preparación del material.

Quisiera por último hacer llegar mi reconocimiento al Dr Robert H.Painter, en cuyo laboratorio me inicié en el estudio de la Inmunología, y al Dr David E.Isenman que supieron transmitirme su entusiasmo por la labor científica.

El trabajo de esta tesis fue llevado a cabo en la Sección Inmunología del Instituto de Investigaciones Médicas, dependiente de la Universidad de Buenos Aires, y en la Sección Inmunología del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina.

INDICE

.Dedicatoria	1
.Agradecimientos	2
.Indice	4
.FUNDAMENTOS Y OBJETIVOS GENERALES	8
.INTRODUCCION:	12
- RESPUESTA INMUNE	13
. Características de las poblaciones celulares involucradas en la respuesta inmune	13
. Interacciones celulares en la respuesta inmune	15
- ACTIVACION DE CELULAS T	19
. Compuestos capaces de activar linfocitos	24
. Acontecimientos asociados a la activación linfocitaria	26
1) Etapas tempranas	
a) Cambios en el flujo de cationes monovalentes	26
b) Flujo de calcio	26
c) Efectos sobre lípidos	
i) Transmetilación y activación de fosfolipasa A ₂	28
ii) Metabolismo del fosfatidilinositol y otros fosfolípidos	29
iii) Metabolismo del ácido araquidónico	29
d) Fosforilación de proteínas	30

e) Variaciones en los nucleótidos cíclicos	30
f) Transporte de moléculas pequeñas	31
2) Etapas intermedias:	
a) Aumento de la velocidad de síntesis proteica	32
b) Aumento de la síntesis de ARN y proteínas	32
c) Actividad de ornitina decarboxilasa y S-adenosil- metionina decarboxilasa	33
d) Metabolismo de hidratos de carbono	33
e) Transformación blástica	34
f) Producción de linfoquinas	34
3) Etapas finales	
a) Proliferación	35
b) Diferenciación	36
- REGULACION DE LA RESPUESTA INMUNE POR METABOLITOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO	38
Vía de las lipoxigenasas	39
Vía de la ciclooxigenasa	43
- TRANSDUCCION DE LA SEÑAL DE ACTIVACION LINFUCITARIA	48
- MODELO DE SENSIBILIZACION IN VIVO	58
- MODELO DE ACTIVACION IN VITRO	63
.MATERIALES Y METODOS	
1) Células efectoras	64

.RESULTADOS

- MODELO DE SENSIBILIZACION IN VIVO

- 1) Efecto de los linfocitos de pacientes chagásicos
sobre la contractilidad de la aurícula de rata 76
- 2) Mecanismo de la reacción 77
- 3) Papel de factores solubles en la reacción 78

- MODELO DE ACTIVACION IN VITRO

- 1) Efecto de los linfocitos activados con PHA
sobre la contractilidad de aurícula aislada de rata 80
- 2) Células efectoras 81
- 3) Mecanismos de reacción 81
- 4) Efecto de linfocitos tratados con ionóforo de calcio 82
- 5) Actividad presente en células y sus sobrenadantes
después de un tiempo breve de exposición a la PHA 84
- 6) Curva dosis-respuesta de sobrenadantes de
activación de linfocitos normales con PHA 85
- 7) Efecto de la diálisis 86
- 8) Comparación del efecto de una lectina mitogénica,
PHA, y una no mitogénica, WGA 86
- 9) Efecto de un inhibidor del flujo de Ca^{2+} y de un
quelante catiónico sobre la generación de
estimulación contráctil y proliferación celular
inducidas por PHA 88
- 10) Efecto de glucocorticoides 88
- 11) Efecto de la cicloheximida 89

12) a) Posibles productos de estimulación linfocitaria presentes en los sobrenadantes	89
b) Efecto de la IL-2	90
13) Curva dosis-respuesta de IL-2	91
14) Efecto cooperativo del ionóforo de calcio y la IL-2	91
15) Posibles mecanismos involucrados en el efecto de la IL-2	92
.DISCUSION	121
.RESUMEN	141
.CONCLUSIONES	143
.ABREVIATURAS UTILIZADAS	145
.BIBLIOGRAFIA	148

FUNDAMENTOS X OBJETIVOS GENERALES

Fundamentos y objetivos generales

Los seres vivos se hallan permanentemente expuestos a agentes del medio ambiente. Los vertebrados, y en particular los seres humanos, han desarrollado un intrincado sistema de detección y defensa para preservar su organismo. Este sistema llamado inmune (del latín *inmunis*: exento) se ha estudiado clásicamente en dos compartimentos: el humoral y el celular. Actualmente se sabe que esta división carece de sentido fisiológico, sin embargo tiene validez operacional para el diseño de algunos experimentos *in vitro*.

Los mecanismos efectores pueden ser mediados por factores solubles (inmunoglobulinas, complemento), por células o por ambos y pueden llevar a la muerte o eliminación del agente invasor. En algunos casos esto no ocurre y se llega a una situación de equilibrio entre el agente infectante y su huésped teniendo así una infección crónica, donde la función del sistema inmune es mantener limitada la infección.

Los leucocitos son las células encargadas de la defensa contra agentes invasores ajenos. Se entiende como ajeno tanto un microorganismo, un parásito multicelular, una proteína o antígeno exógeno (sustancia capaz de inducir respuesta inmune) que de algún modo invadan al huésped, o una célula maligna o infectada por virus, cuya superficie presente antígenos distintos de los nativos del huésped.

La primera línea de defensa está constituida por células fagocíticas: granulocitos y monocitos-macrófagos que inmovilizan, fagocitan y destruyen los agentes invasores. A tiempos más largos, si aún persiste la infección, comienzan a actuar los linfocitos de distintas clases: los B, productores de inmunoglobulinas, y otros efectores de distintos mecanismos citotóxicos, tanto específicos [directos (T) o mediados por anticuerpos (K)] como inespecíficos (NK).

Los leucocitos elaboran una serie de sustancias capaces de activar, inducir o inhibir la proliferación o diferenciación de otros tipos celulares y de favorecer la presencia de las células necesarias en los sitios de inflamación. Estas sustancias se denominan linfoquinas si provienen de linfocitos y monoquinas si son producidas por monocitos-macrófagos y a través de ellas se regula el delicado y complejo equilibrio de la respuesta inmune.

En los últimos años se han descrito diversos mecanismos regulatorios dentro del sistema inmune. Este sistema ha sido considerado autorregulado a través de los circuitos integrados por los distintos tipos de células y mediadores solubles.

En la actualidad existe gran interés en estudiar la relación del sistema neuroendócrino con el sistema inmune. Se trata de una interacción bidireccional, se ha observado que la respuesta inmune induce respuestas endócrinas, autonómicas y centrales (1) a través de sustancias solubles. Del mismo modo, diversas hormonas y neuropéptidos regulan las funciones inmunes (2).

Habitualmente se estudian las interacciones de los distintos

tipos de células dentro del sistema inmune pero existen diversas situaciones en que hay un contacto muy cercano entre linfocitos y otros tejidos, lo que hace posible interacciones directas o a través de factores solubles. El propósito de esta tesis fue estudiar el efecto que tiene la activación de linfocitos periféricos humanos sobre un tejido no relacionado al sistema inmune: el tejido cardíaco.

Para estudiar este efecto se emplearon dos modelos de activación linfocitaria, un modelo de sensibilización in vivo y un modelo de activación in vitro.

Modelo de sensibilización in vivo:

En este caso se utilizaron linfocitos periféricos de enfermos chagásicos crónicos. Se seleccionó la enfermedad de Chagas porque se ha demostrado en el suero de estos pacientes la presencia de anticuerpos con reactividad para tejido cardíaco. Esto implica la presencia de linfocitos que reconocen antígenos de ese tejido. Por otro lado, en este tejido es posible estudiar el comportamiento contráctil, lo que facilita la medición de cambios.

El sistema experimental utilizado para determinar las variaciones producidas en los parámetros de contractilidad fue el ensayo biológico llevado a cabo con la preparación de aurícula aislada de rata.

Modelo de activación in vitro:

En el modelo de activación in vivo existen muchas variables desconocidas o poco regulables tales como tiempo de infección, presencia o no del parásito en circulación, influencia de la respuesta humoral en la actividad linfocitaria, etc.

Por ello se analizó la respuesta de células peritéricas normales humanas frente a estímulos policlonales in vitro. Generalmente se utilizó una lectina mitogénica como la fitohemaglutinina (PHA) tratando de reproducir la activación debida a la exposición in vivo a antígenos del parásito. Este sistema experimental puede ser mejor controlado y muchas de sus variables están mejor definidas. Por este motivo se desarrolló con este modelo la mayor parte del trabajo.

INTRODUCCION

Esta Introducción fue realizada teniendo en cuenta dos objetivos. En la primera parte de la misma (páginas 13 - 37) se describen secuencialmente los diferentes pasos que ocurren en la activación linfocitaria puntualizando las distintas vías metabólicas que intervienen. El propósito es ofrecer un panorama general de estos procesos que permitirán una comprensión integral del tema específico de la tesis.

La segunda parte abarca "Regulación de la respuesta inmune por metabolitos del ácido araquidónico", "Transducción de la señal de activación linfocitaria" y la descripción de los dos modelos empleados (páginas 38 - 63). Con la finalidad de permitir una interpretación más acabada de los "Resultados", la "Discusión" y las "Conclusiones" obtenidos, se desarrollan con más detalle aquellos aspectos directamente relacionados con observaciones experimentales realizadas en este trabajo.

RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune es un mecanismo fisiológico que, como otros, emplea el organismo para intentar mantener su homeostasis.

De acuerdo con Jerne (3) cuando el individuo se enfrenta con un estímulo hay un periodo de desequilibrio. Si la respuesta es adecuada, el equilibrio se restablece. La falta de una respuesta inmune eficiente puede deberse a fallas en diferentes niveles del sistema: al procesamiento del antígeno, a las características propias del antígeno o a un desbalance de las poblaciones celulares que participan de la respuesta inmune.

Varios tipos celulares participan de la expresión y regulación de las reacciones mediadas por células. Cada uno de ellos presenta propiedades definidas y cumple una función característica contribuyendo al balance total de la respuesta.

Características de las poblaciones celulares involucradas en la respuesta inmune:

Inicialmente la caracterización de los leucocitos se realizó por estudios morfológicos. Pudieron distinguirse así polimorfonucleares, monocitos y linfocitos.

Los linfocitos comprenden varias poblaciones celulares que

se pueden identificar funcionalmente o por sus características de superficie. A partir del análisis por rosetas y por inmunofluorescencia se pudieron distinguir los linfocitos B y T (4).

Los linfocitos T humanos normales forman espontáneamente rosetas cuando se los mezcla con eritrocitos de carnero (E) (5). Esta propiedad permitió caracterizar a estas células y separarlas de los linfocitos B aunque debe aclararse que no hay un fundamento inmunológico para este fenómeno. Los linfocitos B, productores de anticuerpos, se caracterizan por presentar en la membrana inmunoglobulinas de superficie que actúan como receptores para el antígeno. El entrecruzamiento de estos receptores al ser ocupados desencadena la activación de estas células.

Con el advenimiento de tecnologías más sofisticadas como el desarrollo de la técnica de hibridomas (6) para producir anticuerpos monoclonales y la fluorocitometría, se pudieron identificar y purificar subpoblaciones de linfocitos T, así como células en distintos estadios de maduración.

Los linfocitos periféricos humanos T expresan el marcador CD3 en un 100%. Además expresan el antígeno CDB (antes llamado TB) o el CD4 (antes T4). Los antisueros anti-CD4 reaccionan con un 60 % de los linfocitos T identificando a la subpoblación con función colaboradora o inductora (T_H) (7). Los antisueros anti-CDB reconocen entre el 20 y el 30 % de las células T periféricas lo que corresponde a la subpoblación con función supresora (T_S) o citotóxica (T_C) (8).

Las funciones principales de los fagocitos mononucleares

(monocitos-macrófagos) son la fagocitosis y el procesamiento y presentación de los antígenos (9, 10). Poseen en su superficie receptores para el fragmento Fc de inmunoglobulinas y para el componente C3 de complemento, lo que facilita la función fagocítica. Además son capaces de producir linfoquinas que actúan sobre otras poblaciones celulares como la interleuquina 1 (IL-1) (11) y el interferón α (IFN α) (12).

Interacciones celulares en la respuesta inmune:

El antígeno es fagocitado y procesado por los macrófagos u otras células presentadoras del mismo. Los macrófagos que actúan en la presentación antigénica son aquellos que tienen en su membrana moléculas Ia (antígenos de clase II) codificadas por genes del complejo mayor de histocompatibilidad (9). Los linfocitos T reguladores reconocen al antígeno sólo cuando éste se expresa en la superficie de otra célula conjuntamente con los antígenos Ia (13, 14).

Además los macrófagos producen y secretan una serie de factores solubles (15) que modifican la actividad de los linfocitos tales como la IL-1 que actúa en la activación de los linfocitos T en maduración y proliferación estimulando la producción de una linfoquina, la interleuquina 2 (IL-2), elaborada por las células T_H . La IL-2 es necesaria para la proliferación de células T (16) y linfocitos de gránulos grandes (LGL) (17).

Por otro lado los macrófagos producen factores que pueden

suprimir inespecíficamente la actividad linfocitaria como prostaglandinas, interferón y metabolitos del oxígeno (18, 19). A su vez los linfocitos producen factores que actúan sobre los macrófagos activándolos o provocando su migración (20, 21).

Cuando el antígeno, presentado por el macrófago, se une al receptor en la superficie del linfocito T ocurre una serie de cambios morfológicos y bioquímicos conocidos como activación linfocitaria (FIGURA 1).

La cooperación celular en la respuesta inmune se encuentra bajo control genético en varios niveles: en particular en la presentación antigénica en la superficie del macrófago u otra célula presentadora (22).

Para que los linfocitos B produzcan niveles adecuados de anticuerpos y los T_c expresen su actividad citotóxica apropiadamente, se requiere la interacción de las células B o T_c respectivamente, con las células T colaboradoras. Estas aumentan la actividad pero el balance se obtiene con la participación de las células T supresoras que regulan negativamente este efecto. A su vez las células T contrasupresoras regulan la actividad de las T_c actuando sobre las T_H (23, 24).

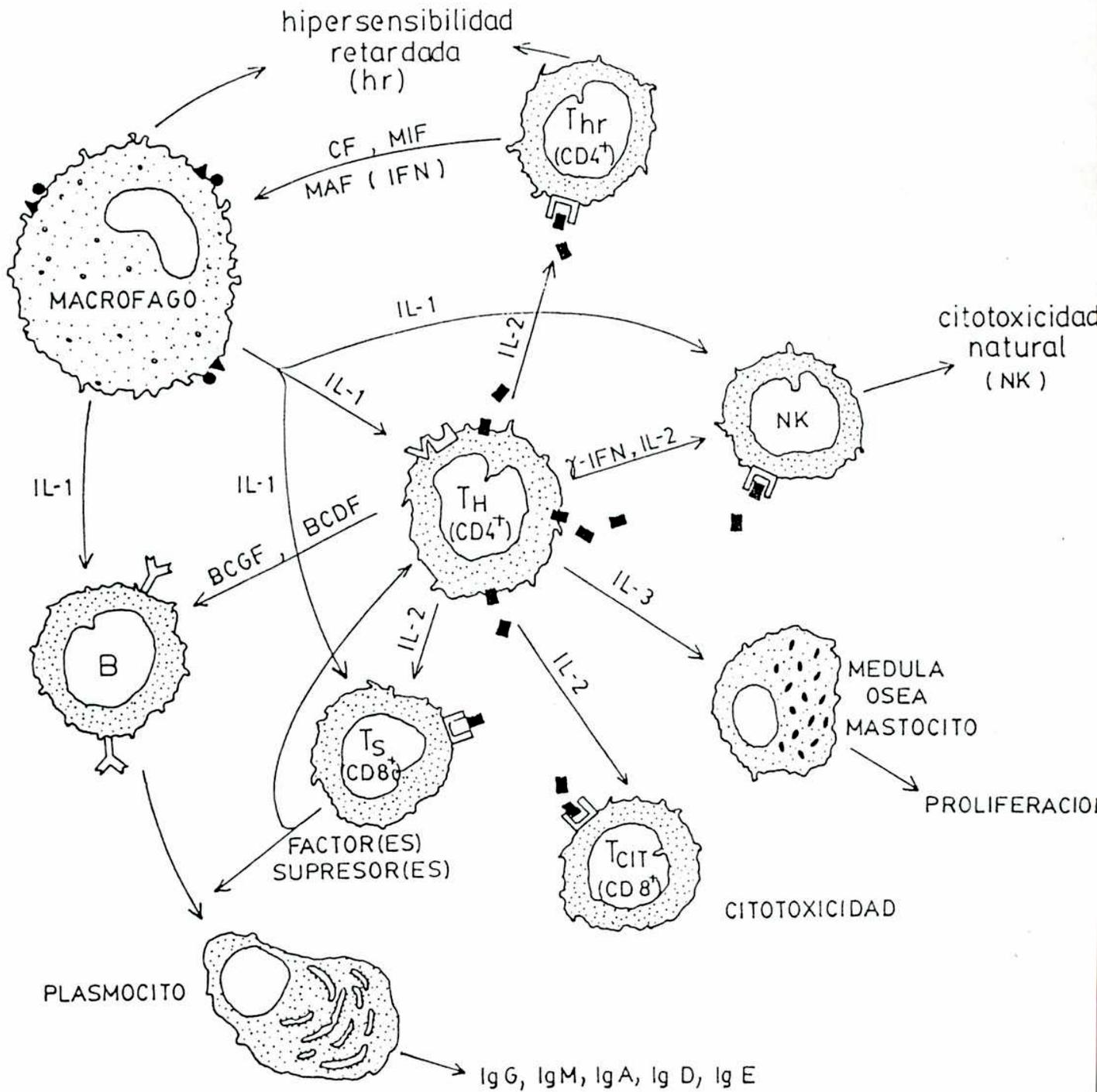
Todas estas interacciones ocurren si los linfocitos T reconocen a los antígenos codificados por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en la superficie de las células con las que deben interactuar. Este fenómeno se denomina restricción de la respuesta inmune por el CMH (25, 26).

El complejo mayor de histocompatibilidad es un complejo de

genes estrechamente ligados que determina la estructura y la expresión de un número de glucoproteínas de la superficie celular : antígenos de clase I y antígenos de clase II. Los linfocitos T de fenotipo CD4 reconocen determinantes antigénicos dentro del contexto de antígenos de clase II. En cambio, los linfocitos T de fenotipo CD8 lo hacen en relación a antígenos de clase I. En su conjunto los genes del CMH han sido implicados principalmente en los mecanismos de discriminación de lo propio con respecto a lo no propio desarrollados por el sistema inmune (27).

FIGURA 1:

Esquema de las interacciones de distintas células y factores solubles derivados de ellas en la respuesta inmune



ACTIVACION DE CELULAS T

La activación linfocitaria T es un proceso complejo que puede culminar con la proliferación celular y/o la expresión de una o más funciones características de la respuesta inmune (diferenciación).

La estimulación puede ser específica o inespecífica. Es específica cuando los linfocitos son expuestos a algún antígeno para el cual ya fueron sensibilizados, es decir del que tienen memoria. En cambio, es inespecífica cuando la activación no requiere exposición previa ni especificidad y puede ser provocada por diversos compuestos como lectinas (28) (ej: fitohemaglutinina (PHA) (29), concanavalina A (Con A)); productos bacterianos; anticuerpos (30) y antígenos de histocompatibilidad; agentes oxidantes como el periodato (31), etc.

Después del contacto con el estímulo (específico o inespecífico) aparecen numerosos cambios bioquímicos y morfológicos, algunos de los cuales pueden detectarse pocos segundos después de la exposición y otros sólo muchas horas y aún días más tarde.

La activación de los linfocitos T, tanto por antígenos presentados en el contexto de los antígenos mayores de histocompatibilidad, como por estímulos inespecíficos comienza a nivel de la membrana (32). Es una secuencia de acontecimientos que ocurre con ramificaciones en varias de sus etapas, aunque no todas ellas llevan a la etapa final (33).

Los linfocitos vírgenes y presumiblemente las células de memoria son células que están en reposo, supuestamente en estadio G_0 . Al ser estimuladas entran en ciclo pasando secuencialmente por los estadios G_1 (neosíntesis de proteínas (enzimas) y ARN) , S (de síntesis de ADN), G_2 (de intervalo, también con síntesis de proteínas, en especial fibrilares y ARN) y M (mitosis) (34). (FIGURA 2)

Los linfocitos en reposo, requieren por lo menos dos tipos de señales para completar el ciclo (35): las primeras de activación que lo llevan a G_1 son generalmente provistas por el antígeno pero la célula sólo comienza a sintetizar ADN si recibe una señal adicional, proliferativa, que puede provenir de factores de crecimiento no específicos (FIGURA 3).

Los cambios metabólicos asociados a la división celular son similares a los que ocurren en otras células pero los linfocitos además maduran a continuación adquiriendo funciones diferenciales que definen las subpoblaciones linfocitarias.

En la mayoría de los estudios de estimulación linfocitaria se emplean activadores policlonales que inducen blastogénesis en un alto porcentaje de la población T. Para células T se utilizan generalmente lectinas vegetales (37). Estos mitógenos inducen un proceso complejo en los linfocitos que depende, entre otras condiciones, de la concentración de lectina utilizada, y del tiempo de exposición a la misma (38).

A pesar de que la evaluación de la estimulación linfocitaria se realiza generalmente por la incorporación de timidina radiac-

tiva tritiada (^3H -timidina) al ADN, la activación de los linfocitos no implica obligatoriamente la síntesis de ADN y la determinación de la incorporación de ^3H -timidina no siempre representa la activación linfocitaria (33).

Actualmente se conoce una serie de factores celulares entre los cuales las llamadas interleuquinas tienen gran importancia en el control del crecimiento de células T (39).

La interleuquina 1 (IL-1) es una citoquina producida fundamentalmente por macrófagos (40) que actúa sobre las células T induciendo la expresión de receptores (41, 42, 43) para interleuquina 2 (IL-2). Los resultados de estudios recientes sugieren que la IL-1 presente en las membranas de las células accesorias es la que actúa en la activación de células T en presencia de antígeno y células presentadoras (44, 45). Así los linfocitos activados por el estímulo antigénico o por mitógenos, que están en G_1 , pueden responder a la IL-2, y continúan el ciclo llegando a la división celular (FIGURA 3).

La evidencia actual indica que la estimulación de linfocitos T por antígenos o lectinas se puede dividir en etapas. En la etapa de preparación para la mitosis se expresan los receptores para IL-2 (46, 47) y se produce IL-2. Generalmente se requiere la presencia del antígeno específico y células accesorias (48). (FIGURA 4)

FIGURA 2:
Ciclo celular

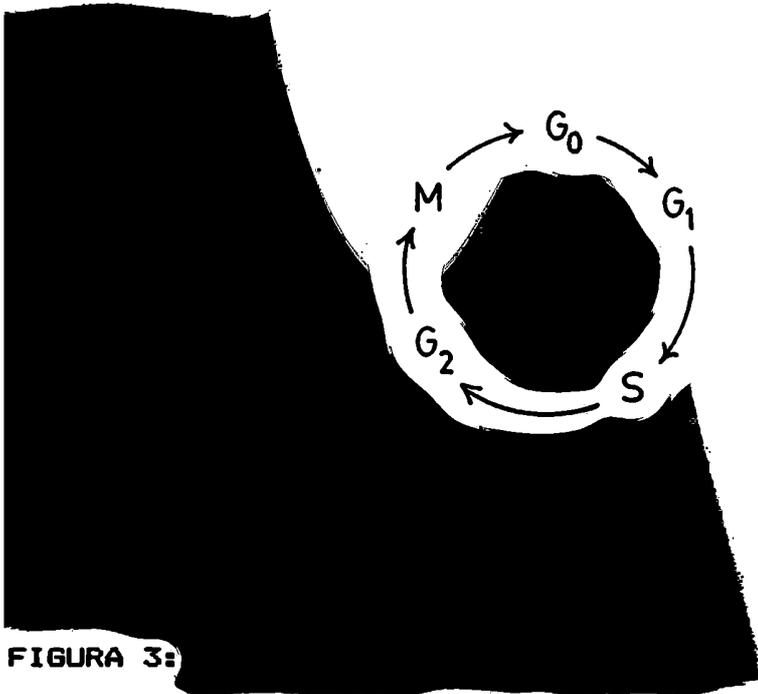


FIGURA 3:
Efecto de citoquinas sobre el ciclo celular

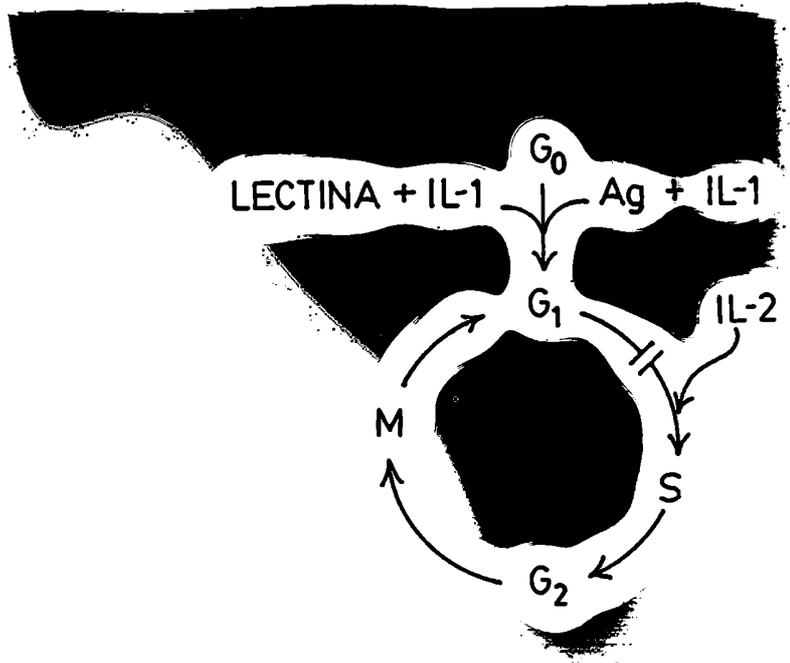
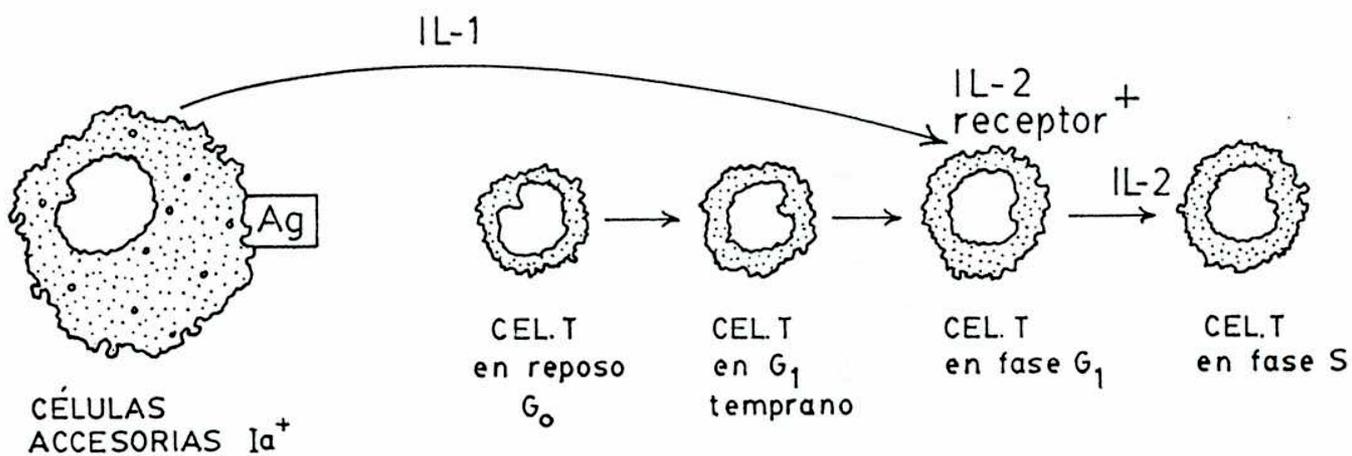


FIGURA 4:

Estadios del ciclo celular para linfocitos T estimulados por antígeno



Esto representa la transición del estado de reposo a G1. La etapa proliferativa involucra a la IL-2, la cual se consume y su efecto biológico permite la progresión a la fase S (36, 41, 49) (FIGURA 4).

El proceso de activación es en realidad el resultado de un conjunto de caminos metabólicos interconectados que funcionan simultáneamente. Un acontecimiento inicial puede afectar varios pasos posteriores a la vez en forma ramificada (por ejemplo el aumento del flujo de Ca^{2+}). Por otro lado existen caminos que no necesariamente llevan a las etapas terminales de activación como el entrecruzamiento de receptores que resulta en el fenómeno de "capping". Además los productos de pasos posteriores pueden ejercer inhibición sobre pasos más tempranos por retroalimentación (33).

Compuestos capaces de activar linfocitos:

Se denominan lectinas a un grupo de glucoproteínas, derivadas de plantas y animales, con capacidad para unirse a hidratos de carbono (37, 51).

Muchas proteínas de la membrana linfocitaria exponen al exterior carbohidratos que pueden unirse a lectinas. En general, esta unión se basa en la especificidad por un azúcar determinado, pero puede abarcar más de un carbohidrato.

Las lectinas utilizadas más frecuentemente para estimular

linfocitos T son la fitohemaglutinina (PHA) con especificidad por residuos de N-acetilgalactosamina, y la concanavalina A (ConA) que se une a manósidos.

Se designan con el nombre de mitógenos a las sustancias que inducen en las células mitosis, es decir división celular. Muchas lectinas son mitogénicas. Sin embargo existen algunas como la aglutinina de germen de trigo (WGA) que se une a los linfocitos y los aglutina pero no induce la división. Puede en cambio inducir varios de los pasos metabólicos iniciales (52, 53, 54). En general existe una concentración óptima de lectina en la que se expresa su efecto mitogénico.

Otros compuestos, distintos de las lectinas, pueden activar a los linfocitos. Entre ellos se cuentan agentes oxidantes (periodato de sodio) (32), algunos cationes como el Zn^{2+} (33), proteasas como la tripsina y la quimotripsina. Estos agentes pueden estimular la síntesis de ADN en algunas subpoblaciones de linfocitos (33). Los ionóforos del Ca^{2+} , tales como el A23187, inducen un incremento del flujo de Ca^{2+} al insertarse en la membrana como proteínas integrales. En los linfocitos se observó que pueden actuar como señal mitogénica (55).

Acontecimientos asociados a la activación linfocitaria:

1) Etapas tempranas:

Estos acontecimientos ocurren en segundos o minutos.

a) Cambios en el flujo de cationes monovalentes:

En los linfocitos, como en muchas otras células, se halla presente una enzima, comúnmente llamada bomba catiónica: la sodio-potasio ATP-asa, que bombea sodio hacia afuera y potasio hacia adentro de la célula en contra de un gradiente de concentración. Se ha demostrado que la toma de ^{42}K por linfocitos humanos estimulados con PHA aumenta apenas 30 segundos post contacto llegando a duplicarse 1 hora después. En forma paralela se incrementa la salida de Na^+ (33, 56). En realidad no hay cambios netos de concentración ya que se observó eflujo de K^+ e influjo de Na^+ equivalentes. Así, lo que se modifica sería la permeabilidad para estos cationes cambiando el potencial electroquímico a través de la membrana (57). Se describieron canales de K^+ asociados a la activación celular (58)

b) Flujo de calcio:

La concentración fisiológica de Ca^{2+} extracelular es generalmente mayor que la intracelular, de modo que la entrada de

este ión se produce a favor de un gradiente de concentración por difusión y la salida es por transporte activo.

La membrana celular es muy poco permeable al Ca^{2+} . Hay dos sistemas de bombeo: el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y la ATP-asa llamada bomba de Ca^{2+} . El control de la actividad celular se obtiene por liberación de iones Ca^{2+} de depósitos intracelulares y por los flujos de Ca^{2+} a través de canales proteicos específicos (59). Estos canales pueden ser de varias clases (60), a saber:

- 1) los llamados canales de pérdida que reflejan que la membrana es algo permeable, no son verdaderos canales;
- 2) los llamados canales sensibles al estiramiento que probablemente tampoco sean canales sino la consecuencia de una perturbación mecánica que afecte la permeabilidad;
- 3) los canales sensibles al voltaje que se encuentran presentes en muchos tejidos;
- 4) los canales operados por receptores cuya existencia se propuso para explicar que muchas uniones receptor-ligando activan el influjo de Ca^{2+} en ausencia de cambios de potencial de membrana.

El Ca^{2+} es fundamental para la estimulación de los linfocitos ya que si la concentración del ión en el medio es menor que 10^{-8}M no hay respuesta (61). Ya se mencionó además que el ionóforo de calcio A23187 es capaz de inducir la síntesis de ADN (62, 63, 64).

Aunque la entrada de calcio no es dependiente de energía, se inhibe con drogas que aumentan la concentración de cGMP o dismi-

nuyen la de cAMP (65). Por otro lado, el calcio activa la guanilato ciclasa celular cerrando un ciclo de retroalimentación negativa. Esta enzima y la calmodulina podrían vincular la entrada de calcio con el aumento de la fosforilación de otras enzimas claves en la transmisión de la señal.

c) Efectos sobre lípidos:

i) Transmetilación y activación de fosfolipasa A₂:

La activación de metiltransferasas de membrana es uno de los acontecimientos más tempranos (64, 66). Estas enzimas catalizan la transferencia de grupos metilo de S-adenosil-metionina a fosfatidiletanolamina generando fosfatidilcolina. Se observó que esto tiene como consecuencia una reducción en la viscosidad de la membrana plasmática y se postuló que los fosfolípidos metilados podrían estar involucrados en la formación de un canal transitorio para calcio. La entrada de calcio a su vez es indispensable para que se active la fosfolipasa A₂ (PLA₂) que libera el ácido graso que sustituye la posición 2 del glicerol en la fosfatidilcolina produciendo lisofosfatidilcolina. El ácido graso más frecuentemente encontrado en posición 2 es el ácido araquidónico. La lisofosfatidilcolina a su vez activa la guanilato ciclasa y suprime a la adenilato ciclasa (33). Agentes ionóforos del calcio pueden activar directamente a la PLA₂ al aumentar el influjo de este catión.

Toyoshima y col. (64) sugieren que para que haya síntesis de ADN son necesarias tanto la metilación como la degradación de

fosfolípidos por PLA₂, aunque otros autores (67) restan importancia a la transmetilación.

ii) Metabolismo del fosfatidilinositol y otros fosfolípidos:

El fosfatidilinositol (PI) representa no más de un 10% de los fosfolípidos de membrana de células de mamíferos. Sin embargo, muchas células reaccionan ante estímulos externos acelerando el metabolismo de este compuesto (68).

En los linfocitos estimulados con PHA o ConA a los 5 minutos el 10% del PI pasó a 1,2-diacilglicerol y fosfatos de inositol en una reacción catalizada por fosfolipasa C (PLC), enzima citoplasmática que requiere baja concentración de calcio para su actividad. La activación del metabolismo del PI es inducida por lectinas mitogénicas y no por las no mitogénicas (33).

La síntesis de novo de fosfatidilcolina también se acelera alrededor de 1h post estimulación con un mitógeno T (69). Además aumenta la incorporación de ácidos grasos a la fosfatidilcolina (Resch, Ferber), la incorporación de colina a los fosfolípidos y el recambio de fosfolípidos (33).

iii) Metabolismo del ácido araquidónico:

El ácido araquidónico (AA) es liberado como ya se dijo, de los fosfolípidos por la fosfolipasa A₂ (70).

Los metabolitos del AA, producidos por dos vías enzimáticas de oxidación, son importantes en la regulación de procesos inflamatorios (33). Este metabolismo y los efectos producidos por los

compuestos en él formados se detallan más adelante.

d) Fosforilación de proteínas:

La activación de muchas enzimas ocurre por fosforilación, por lo que al verificar la incorporación de ^{32}P en linfocitos estimulados con Con A se infirió que esto ocurría también como un suceso temprano de la activación linfocitaria (71). Las proteínas de las partículas ribosomales que contienen las transcripciones de los ARN primarios son las primeras que se fosforilan. Hay evidencias experimentales de que la fosforilación temprana depende de la redistribución del calcio citoplasmático por la calmodulina. Después de 4 a 8h de estimulación con ConA se observa un incremento transitorio de la fosforilación en las proteínas nucleares diferentes de las histonas. Más tarde, en el momento inmediatamente previo a la incorporación de timidina, la fosforilación proteica aumenta nuevamente (33).

e) Variaciones en los nucleótidos cíclicos:

Numerosas hormonas y ligandos transmiten la señal al interior de la célula por medio de la adenosina 3'5' monofosfato cíclico (cAMP) o bien de la guanosina 3'5' monofosfato cíclico (cGMP). La reacción enzimática que los produce requiere calcio (72). En muchas situaciones uno ejerce un efecto opuesto al del otro.

Existen evidencias contradictorias respecto de la relevancia de este mecanismo en la activación linfocitaria, probablemente

debido a que se emplean poblaciones mixtas de linfocitos. Cada una de estas puede responder de manera diferente y además las células pueden no encontrarse sincronizadas (73).

En los linfocitos periféricos humanos tratados con PHA se observa un aumento de la concentración de cGMP. Se ha descrito que los efectos de la unión receptor-ligando en sistemas dependientes de la adenilato ciclasa son mediados a través de un conjunto de proteínas que se unen a nucleótidos de guanina modulando la interacción de los receptores con la enzima (74) y se supone que en las señales dependientes del ciclo del PI también actúan proteínas de este tipo (33).

f) Transporte de moléculas pequeñas:

Durante las etapas iniciales de activación se observa también una aceleración en el transporte de azúcares (65) y luego de aminoácidos (62) y nucleósidos.

En un medio libre de glucosa la estimulación mitogénica no lleva a la síntesis de ADN pero sí se consigue aumento de la síntesis proteica y de ARN. Esto sugiere que el proceso seguido durante la activación linfocitaria presentaría ramificaciones algunas de las cuales pueden completarse aún en ausencia de glucosa (33).

2) Etapas intermedias:

a) Aumento de la velocidad de síntesis proteica:

Después de 2 o 3 horas de estimular linfocitos con PHA o ConA puede detectarse aumento en la síntesis proteica (75) llegando a un máximo entre 48 y 72 horas después del contacto.

Son numerosas las proteínas sintetizadas en este proceso pero la síntesis de todas ellas no se realiza simultáneamente. Se pueden incluso observar diferencias en células estimuladas con distintas lectinas. La actina aumenta en las primeras horas mientras que las proteínas de la matriz nuclear se incrementan a las 12 horas produciendo un aumento muy grande del tamaño del núcleo correspondiente a los blastos (33).

b) Aumento de la síntesis de ARN y de proteínas:

En los linfocitos en reposo no se produce síntesis de ADN pero sí, en pequeña cantidad, de proteínas y ARN. Con la estimulación por mitógenos esta síntesis se incrementa. Se observa a las 6 horas del estímulo, y generalmente se evalúa por la incorporación de uridina tritiada.

Podría ser que un aumento tardío de cAMP tras la estimulación con PHA cause la aceleración de la síntesis de ARN pero esto no varía el transporte de uridina ni la menor degradación de ARN, por lo que no basta para explicar todos los efectos(33).

Los ribosomas se transforman en poliribosomas a las 20 horas de estimulación con PHA y entonces comienza la síntesis proteica.

Con el tiempo aumenta en forma absoluta la masa de ARN pero no en relación a la masa celular (33).

c) Actividad de ornitina decarboxilasa y S-adenosil-metionina decarboxilasa:

La ornitina decarboxilasa es una enzima dependiente de calcio asociada al crecimiento de casi todas las células de mamíferos. Su vida media es muy breve y su actividad se hace notoria en el estadio G1 del ciclo celular. Es el factor limitante en la síntesis de poliaminas aniónicas (putrescina, espermidina y espermina) compuestos anfifílicos capaces de movilizar calcio y activar la síntesis de novo de PI. La S-adenosil-metionina decarboxilasa convierte la putrescina en espermidina y ésta en espermina. Su actividad también aumenta alrededor de 6h post estímulo. Aparentemente la síntesis de espermina sería requerida para que los linfocitos pasen del estadio G1 al S (33).

d) Metabolismo de hidratos de carbono:

La glucosa es uno de los compuestos cuya toma se acelera en el proceso de activación linfocitaria. La glucólisis aerobia, principal fuente de energía para el linfocito en reposo también aumenta, incrementándose la actividad de varias enzimas. Así la actividad de fosfofructoquinasa aumenta ante el estímulo mitogénico en forma paralela a la síntesis de ADN (76). Por su parte, la actividad de glucosil-transferasa se incrementa también (33).

e) Transformación blástica:

Se refiere al gran cambio morfológico que puede observarse al microscopio óptico. Los linfoblastos presentan un núcleo denso y muy aumentado, y un citoplasma escaso, basófilo y con vacuolas además de un gran tamaño celular. Entre 12 y 24 horas después de la estimulación aumenta la masa del núcleo y del citoplasma. Este paso requiere absolutamente la síntesis de proteínas ya que el incremento del tamaño del núcleo se debe mayormente a la acumulación de proteínas recién formadas (33).

t) Producción de linfoquinas:

Los mitógenos inducen en la superficie de los macrófagos una expresión mayor de antígenos fundamentales para la presentación antigénica a linfocitos T. Además inducen secreción de IL-1 que actúa conjuntamente con mitógenos, antígenos o aloantígenos induciendo en las células T la expresión de receptores para IL-2 (IL-2 R). Estos últimos cambios ocurren unas 5h después de la estimulación. La IL-2 es producida por una subpoblación T, la CD4+, en respuesta al estímulo antigénico o mitogénico (77, 78). Es una glucoproteína con un peso molecular de aproximadamente 15000, estable a pH ácido y a cambios de temperatura. Presenta actividad no restringida por la barrera de especies y actúa a través de un receptor ausente en células en reposo (79). Se describieron dos clases de receptores para IL-2: el que se identifica con el antígeno Tac (de célula T activada) de baja afinidad ($K_d = 10^{-6}M$) y otro que tendría además una segunda cadena

peptídica (80) y que sería el que actúa en proliferación celular, de alta afinidad ($K_d = 10^{-11}M$) (81). En presencia de IL-2 se induce además la producción de interferón γ (IFN γ) (82, 83).

Además se expresan otros antígenos de superficie comunes a otras células activadas como los receptores para insulina (84, 85) y transferrina (86).

3) Etapas finales:

Estos acontecimientos ocurren luego de días de estimulación.

a) Proliferación:

Cuando se tratan los linfocitos con PHA o con ConA, a las 36 horas comienza la síntesis de ADN (fase S del ciclo celular) y se hace máxima entre 48 y 72 horas después del estímulo. Otros mitógenos requieren tiempos más prolongados de reacción (33).

El ensayo más utilizado para cuantificar la activación linfocitaria es el de incorporación de timidina tritiada, que en realidad no permite discriminar entre transporte de nucleósidos y síntesis de ADN ni aumento neto o síntesis de reparación. Se elige este precursor porque es rápidamente transportado al interior de la célula y porque contiene la única base exclusiva del ADN (33).

En esta etapa se duplica todo el material celular y luego cada linfocito se divide por mitosis dando origen a dos células hijas que contienen toda la información presente en la célula

madre.

Finalmente, después de la división, disminuye la actividad metabólica y las células vuelven a su estado de reposo.

La mayoría de estos efectos ha sido investigada en linfocitos estimulados con mitógenos ya que se facilita el estudio al responder gran proporción de las células al estímulo. Con antígenos la situación se complica al ser pequeño el número de células respondedoras. No obstante, debe tenerse en cuenta que las moléculas entrecruzadas por la unión con mitógenos no son las mismas que con antígenos y que por ende los pasos iniciales del proceso podrían ser diferentes aunque el resultado final sea el mismo (33).

b) Diferenciación:

La activación de linfocitos T no siempre culmina en proliferación. Cuando el antígeno ocupa su receptor en células T maduras, desencadena una secuencia de acontecimientos que, en ausencia de división celular, puede dar origen a linfocitos funcionales diferenciados ya sea citolíticos, colaboradores o supresores. Por ejemplo, en el proceso de diferenciación de células T citotóxicas, al recibir el estímulo antigénico las células precursoras expresan receptores para diversas hormonas y linfoquinas, en particular para IL-2 que desempeña un papel fundamental. Para que esto ocurra intervienen diversas subpoblaciones de células T: las T_H al recibir la señal del antígeno y de la célula accesoria producen IL-2 y las precursoras de T_C , activadas por el antígeno,

reciben la señal de la IL-2 convirtiéndose en linfocitos T_e efectores (87).

Otro ejemplo de diferenciación independiente de la etapa proliferativa es la inducción de la secreción de IFN γ por células T_H o su producto IL-2 (88). Johnson y col.(83) comprobaron que células T, que son potenciales productoras de IFN γ , pueden ser inducidas a secretarlo aunque estén detenidas en el ciclo celular por acción de mitomicina C .

REGULACION DE LA RESPUESTA INMUNE POR METABOLITOS DEL ACIDO
ARAQUIDONICO

Los metabolitos del AA regulan diversas etapas de la respuesta inmune. El AA es un ácido graso con una cadena hidrocarbonada de 20 átomos de carbono que contiene 4 dobles ligaduras en posición 5, 8, 11 y 14. Sus dobles enlaces pueden ser objeto de ataque a través de dos vías enzimáticas oxidativas: la de la ciclooxigenasa y la de las lipoxigenasas (89) (FIGURA 5).

La disponibilidad de AA libre es el paso limitante de la producción de metabolitos de este tipo. En el caso de la 5-lipoxigenasa, la enzima debe además ser activada previamente.

Los productos del AA varían en cuanto a la célula que los origina, a su efecto biológico y a su estabilidad. Con frecuencia, hay metabolitos que ejercen efectos opuestos. Son por lo general producidos por células activadas y no en reposo, y no se acumulan en cantidades significativas. Forman un conjunto de agentes moduladores cuya función en la regulación de la respuesta inmune es motivo de muchos estudios actuales.

Como ya se mencionó, en las células vivas el AA se halla formando parte de los fosfolípidos o triglicéridos por lo que para que sea liberado debe producirse una acción enzimática que provoque la ruptura de la unión éster (FIGURA 6).

Como generalmente el AA sustituye la posición 2 del fosfolípido, su liberación involucra a la fosfolipasa A₂ (90). También puede liberarse por el efecto secuencial de dos enzimas: la

fosfolipasa C (PL-C) y la diacilglicerol lipasa. Los productos de la acción de la PL-C dependen de la naturaleza del sustrato. Así, cuando el triglicérido es un fosfoinosítido, los productos son diacilglicerol (DAG) y fosfatos de inositol. Luego, la diacilglicerol lipasa actúa sobre el DAG dando origen al monoacilglicérido y al ácido graso libre. Dada la ubicación del AA en numerosos triglicéridos de origen animal, el ácido graso liberado suele ser AA libre (91, 92, 93). En las plaquetas también puede originarse a través de una fosfolipasa que actúa sobre el ácido fosfatídico (94) (FIGURA 6).

Una vez libre, el AA da origen a diversos metabolitos según cuáles sean las enzimas presentes en las células.

Vía de las lipoxigenasas:

Las lipoxigenasas convierten el AA en hidroperóxidos (H-PETEs) reordenando las dobles ligaduras. Según cual sea el C sobre el que actúan se las denomina 5-, 12-, o 15- lipoxigenasas. Su actividad se manifiesta rápidamente en los primeros 5 a 10 minutos después de la activación celular y luego se detiene. Estos hidroperóxidos pueden ser reducidos enzimática o no enzimáticamente produciendo los correspondientes hidroxiácidos (HETEs).

En los leucocitos y mastocitos predomina la 5-lipoxigenasa (95). Los monocitos y neutrófilos poseen además una 15-lipoxigenasa (96) mientras que en las plaquetas, se encuentra la 12-lipoxigenasa (97). La 5-lipoxigenasa convierte el AA en 5-HPETE

que es reducido luego a 5-HETE o leucotrienos (LTs). En presencia de otras lipoxigenasas se pueden originar también productos mixtos de oxidación: 5,15-diHETE, 5,12-diHETE, etc. (98).

Los leucotrienos derivados del ácido araquidónico presentan 4 dobles ligaduras por lo que a la letra que los identifica se le añade el subíndice 4. Inicialmente se forma el LTA₄, epóxido inestable, del que puede derivar por un lado el LTB₄ y por otro un conjunto de LTs asociado a la sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRS-A), cuya actividad biológica se conoce desde hace mucho tiempo (99).

La SRS-A está formada por el LTC₄ (100), LTD₄ y LTE₄ que contienen una unión tioéster en el C6 (101) (FIGURA 5). Estas sustancias pueden ser producidas por una variedad de células, como ser los monocitos, los basófilos y los eosinófilos, ante estímulos tales como ionóforo de calcio, veneno de cobra, complejos inmunes, etc. Las reacciones alérgicas son mediadas en parte por la SRS inducida por inmunoglobulina E (102). La actividad más estudiada de la SRS-A es su efecto espasmogénico sobre músculo liso y es utilizada comúnmente para valorar su actividad biológica.

Las respuestas inducidas por la SRS-A son bloqueadas selectivamente por el compuesto sintético FPL-55712 (103) mientras que la actividad de las lipoxigenasas se inhibe con antioxidantes como el NDGA o la vitamina E (104). También se utiliza como inhibidor competitivo el ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico (ETYA), que presenta 4 triples ligaduras en lugar de las 4 dobles

ligaduras del AA (105). Algunos autores observaron que no inhibe la 5-lipoxigenasa (106) pero sí el pasaje de 5-HPEIE a LTA₄. El también EYA puede inhibir la ciclooxygenación.

El LTB₄ (107) posee importantes efectos quimioquímicos y reguladores. Es producido por mastocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos y, según se verificó recientemente (108), linfocitos. Estimula el movimiento celular y la liberación de enzimas lisosomales de neutrófilos (109) aunque algunos autores discuten la relevancia fisiológica de este último efecto.

El agregado de LTB₄, aún en concentraciones del orden de 10⁻¹⁴M, a cultivos de células mononucleares periféricas estimuladas por PHA o ConA inhibe la proliferación por inducción de células supresoras (110). Análogamente, inhibe la producción polyclonal de IgG e IgM en linfocitos periféricos humanos estimulados con PWM (111) y ejerce efectos diferenciales sobre distintas subpoblaciones de linfocitos T (112). Otros autores encontraron que la producción de LTB₄ antecede la liberación de IL-2 y por ende es necesaria para la proliferación de linfocitos T (108). Uno de los mecanismos por los que los glucocorticoides inhiben la proliferación linfocitaria, sería su interferencia con la formación de LTB₄, al impedir por vía de la macrocortina la disponibilidad de AA libre (108). Este leucotrieno puede comportarse como ionóforo de calcio (113, 114). Su actividad se ejerce a través de un receptor específico que ha sido bien caracterizado (115).

El LTB₄ es suficiente para suplir algunos efectos de la IL-2 como la síntesis de IFN γ (83), pero no reemplaza a la IL-2 como

estímulo de proliferación (108).

Varios autores describieron efectos estimulantes de productos de 5-lipoxigenasas sobre la actividad citotóxica natural de linfocitos (NK) (116, 117, 118).

En cambio, el 15-HPETE induce células supresoras en un sistema de producción de anticuerpos (119) e inhibe la proliferación celular (120), lo mismo que el 15-HETE (121).

Varios de estos compuestos ejercen control por retroalimentación sobre enzimas del metabolismo oxidativo del AA. Así el 15-HETE (122) inhibe la actividad de la lipoxigenasa plaquetaria y el 12-HETE (123) inhibe la de la 5-lipoxigenasa. Por otro lado Vanderhoek y col. describieron activación de la 5-lipoxigenasa por 15-HETE (124).

El 5-HETE es el compuesto cuantitativamente más importante de la 5-lipoxigenasa de leucocitos y mastocitos. Induce movilización celular y la liberación de enzimas de los gránulos específicos de los neutrófilos (125). No se conoce su mecanismo de acción aunque se observó que puede incorporarse covalentemente a fosfolípidos y triglicéridos lo que podría afectar la fluidez de la membrana celular. Otros autores encontraron que los hidroperóxidos de ácidos grasos pueden estimular la guanilato ciclasa aumentando la concentración de cGMP intracelular (126).

Las lipoxinas A y B se forman por múltiples lipoxigenaciones. Tienen actividad en la generación de metabolitos activos del oxígeno y desgranulación de neutrófilos (127).

Como se deduce de esta descripción, los productos de la

lipoxigenación del AA desempeñan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune ejerciendo diversos efectos sobre distintas poblaciones celulares dentro del sistema inmune. Fuera del mismo se describe un conjunto de efectos que varía según el tejido sobre el que se ejerce su acción. Por ejemplo el tejido cardíaco puede producir leucotrienos (128) y a su vez ser afectados por éstos (129, 130).

Vía de la ciclooxigenasa:

La ciclooxigenasa es un conjunto enzimático que cataliza la formación de 2 compuestos intermedios inestables a partir del AA: PGG_2 y PGH_2 , que contienen un anillo de ciclopentano (FIGURA 5).

Según cuales sean las enzimas presentes en la célula o el tejido, aparecerán prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) o prostaciclina (PGI) como productos finales. Frecuentemente se obtienen mezclas de estos compuestos (131).

Los antiinflamatorios no esteroides como el ácido acetil-salicílico (ASA) y la indometacina bloquean la ciclooxigenasa impidiendo la formación de los intermediarios y por lo tanto de los productos finales.

Las PGs son ácidos grasos con un anillo de ciclopentano. Las PGs E, F y D difieren en el tipo de sustituyentes en el anillo. Cuando contiene 2 dobles ligaduras se agrega el subíndice 2 (PGE_2 , PGF_2 y PGD_2) (131).

Los macrófagos y monocitos producen una gran cantidad de

PGE_2 (132) y también PGF_2 y los neutrófilos cantidades moderadas de PGE_2 ; los mastocitos producen PGD_2 (131).

Diversos investigadores estudiaron la producción de PGs inducida por distintos estímulos en macrófagos (133). Muchos de estos estudios se llevaron a cabo con poblaciones celulares que contenían linfocitos observándose (134) que las citoquinas (IL-1, IFN) estimulan la producción de PG por los macrófagos. A su vez, las PGs inhiben la producción de linfoquinas y la mitogénesis de células T, cerrando así un ciclo de control negativo.

Las PGs liberadas en un órgano no modulan la función celular en otro órgano, en general actúan localmente. En el sistema inmune la PGE_2 es la más estudiada. Esta PG induce la diferenciación de timocitos inmaduros, linfocitos B y precursores de células hematopoyéticas a células maduras (134). Si se incuban timocitos con PGE_2 , aumenta la concentración de cAMP y se induce proliferación (135). Por otro lado, la PGE_2 inhibe la formación de colonias de macrófagos y de células T de médula ósea (136). También ejerce efectos sobre células maduras: inhibe la proliferación de linfocitos T (137) y B (138), la quimiotaxis de leucocitos, la agregación de éstos y su metabolismo oxidativo, la citotoxicidad mediada por células T, la citotoxicidad NK, la liberación de monoquinas y linfoquinas (131).

Las prostaglandinas pueden tener tanto actividad pro-inflamatoria como anti-inflamatoria. Su mecanismo de acción sería dependiente de los cambios en los niveles de cAMP intracelular y su acción se ejercería a través de un receptor de la membrana

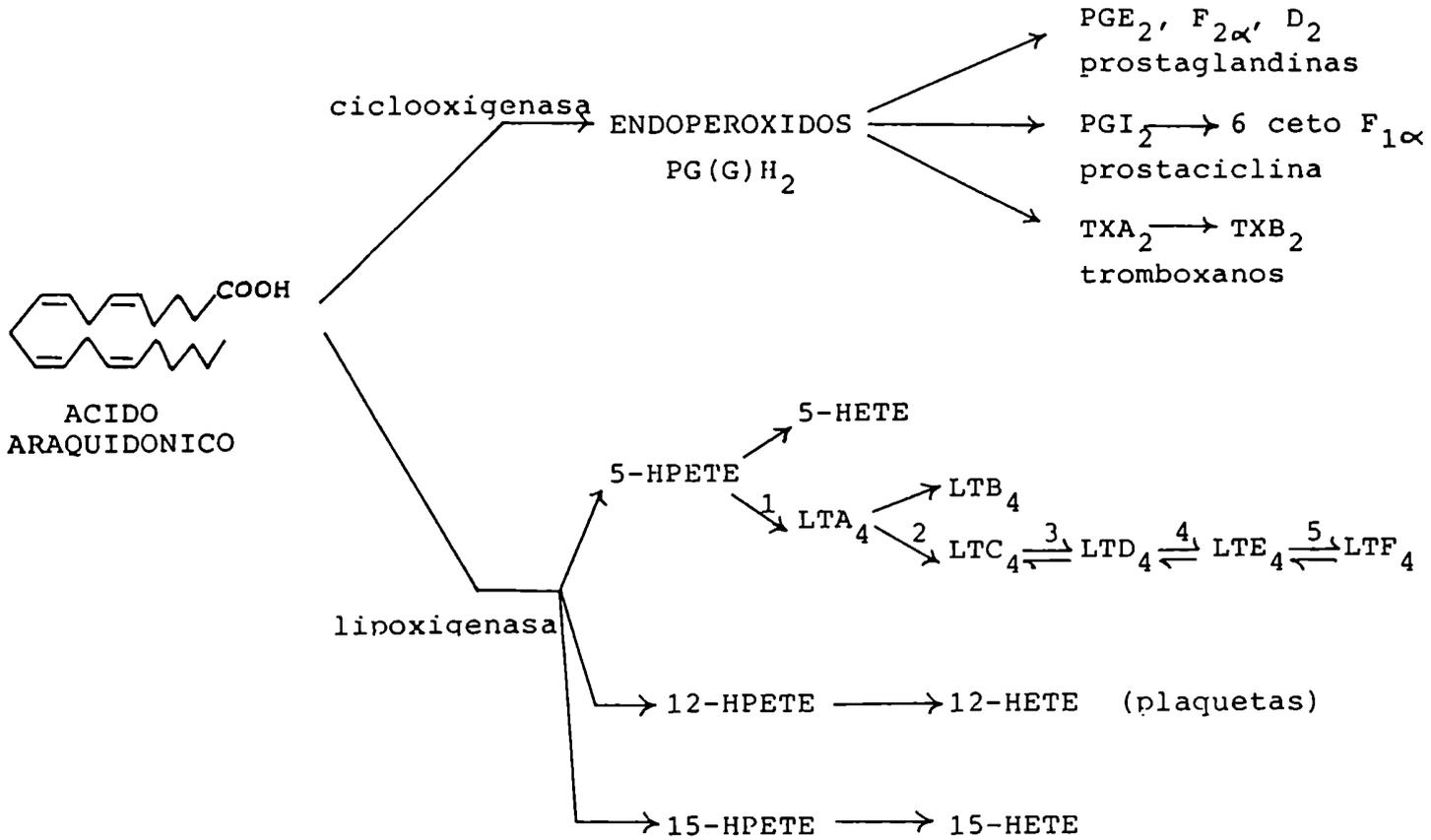
plasmática (139). En el sistema inmune, las PGs no inician respuestas por sí mismas sino que modulan las respuestas inducidas por otros estímulos y actúan específicamente sobre la respuesta de una población celular determinada en un momento dado, lo que explica las aparentes contradicciones de sus efectos (140).

El tromboxano (TX)A₂ es producido por la tromboxano sintetasa, enzima que es inhibida por derivados del imidazol en forma selectiva y también por antioxidantes. Se forma en plaquetas, monocitos y macrófagos y su vida media es de 30 segundos pasando luego a TXB₂, metabolito que habitualmente se mide con los radioinmunoensayos (131). El TXA₂ es vasoconstrictor y promueve la agregación plaquetaria (141). Se ha sugerido también que está involucrado en la proliferación de linfocitos (142) y en la actividad citotóxica natural (143).

La prostaciclina (PGI₂) se forma en el endotelio vascular y probablemente en macrófagos. Una misma célula no produce simultáneamente TXA₂ y PGI₂, metabolitos del AA que poseen efectos opuestos. La PGI₂ es un vasodilatador e inhibe la agregación plaquetaria, además aumenta la permeabilidad vascular. La prostaciclina ejerce su actividad a través del incremento del cAMP intracelular (131).

FIGURA 5:

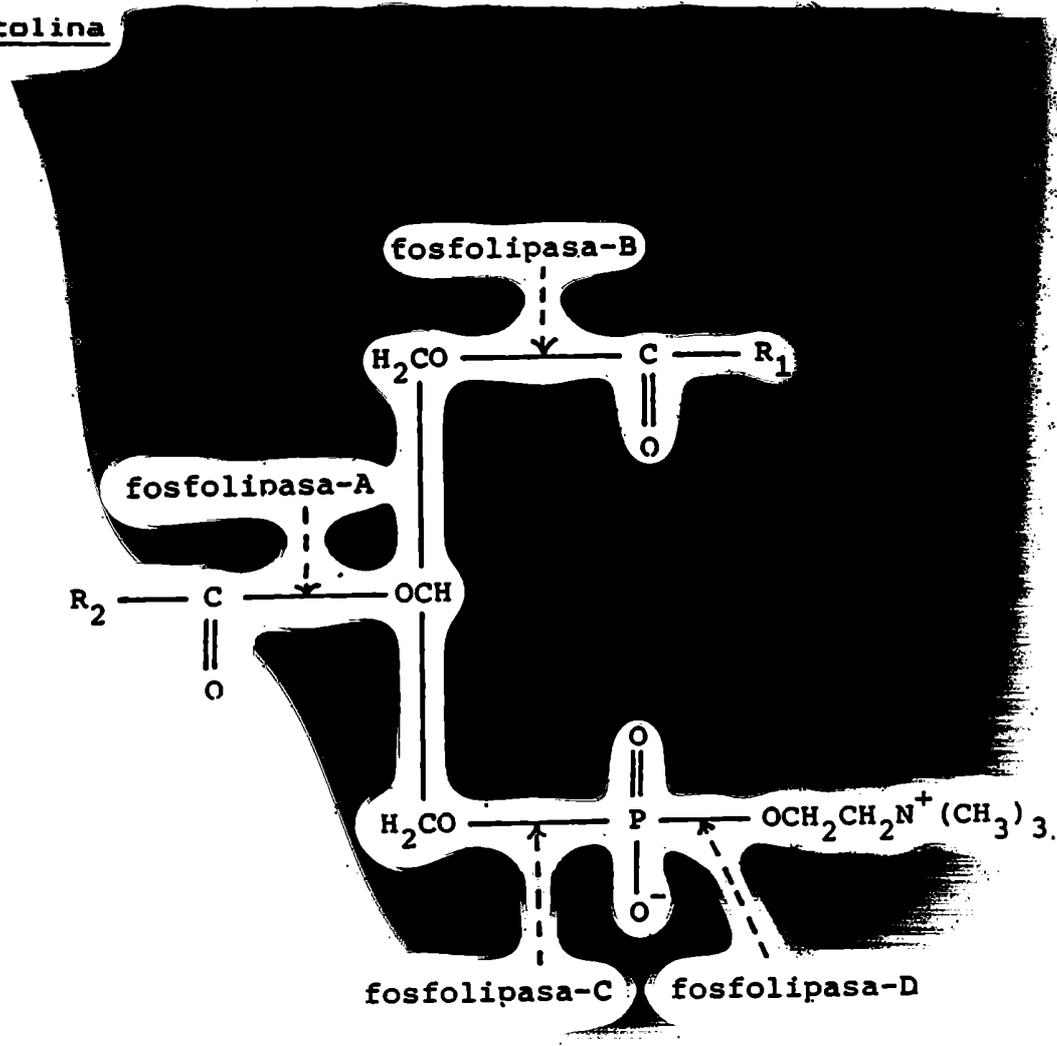
Metabolismo del ácido aráquidónico: vía de la ciclooxigenasa y de las lipoxigenasas



- 1 hidroperoxidasa
- 2 glutati6n S-transferasa
- 3 γ-glutamil transpeptidasa
- 4 cisteinilglicinasa
- 5 γ-glutamil transpeptidasa

FIGURA 6:

Sitios de acción de las distintas fosfolipasas sobre fosfatilcolina



TRANSDUCCION DE LA SEÑAL DE ACTIVACION LINFOCITARIA

La señal que dispara la activación linfocitaria se produce a nivel de la membrana celular. En general se han estudiado las interacciones de distintos tipos de ligandos con receptores en la superficie de las células T y los acontecimientos finales a que conduce la activación, pero se conocen menos los pasos bioquímicos intermedios. Podría ocurrir que diferentes señales de activación actuando a través de diversos receptores compartan un mismo camino de transducción (esto se refiere al modo en que la señal extracelular se transmite al interior de la célula a través de la membrana)(144). Esta hipótesis fue propuesta por J.E.-Blalock para el interferón y la norepinefrina (145). Alternativamente, distintas subpoblaciones de linfocitos T podrían requerir señales diferentes para activar sus funciones específicas(146).

Los linfocitos poseen en la superficie de su membrana receptores para ligandos variados tales como antígenos y factores de crecimiento y diferenciación. La especificidad de la respuesta inmune se basa precisamente en la diversidad de los receptores específicos para antígenos y la expresión selectiva de

los receptores para distintos factores. En cambio, el sistema de transducción de la señal dada por el ligando es compartido por un gran número de estos. Esto puede ocurrir tanto en el caso de los linfocitos como en muchos otros tipos celulares (144). A través del mensajero intracelular, llamado segundo mensajero, no sólo se transmite la señal sino que se la amplifica. La respuesta final depende de las funciones efectoras que están genéticamente predefinidas para cada célula madura y diferenciada. Se expresa en procesos celulares tales como secreción, contracción, fototransducción o crecimiento celular.

El sistema de la adenilato ciclasa fue el primer sistema de segundo mensajero descrito (72). El mensajero intracelular es el 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). Este mensajero actúa a través de quinasas que fosforilan numerosas proteínas que participan en la generación del efecto final. Los receptores ocupados se acoplan con la enzima a través de proteínas reguladoras llamadas G. Una de ellas se disocia en 2 unidades una de las cuales tiene la propiedad de unirse a fosfatos de guanosina (difosfato (GDP) y trifosfato GTP) (FIGURA 7). La proteína G unida a GTP interacciona con la adenilato ciclasa de la membrana y la activa para que a su vez forme cAMP. A su vez hay una proteína G inhibidora que regula negativamente (74).

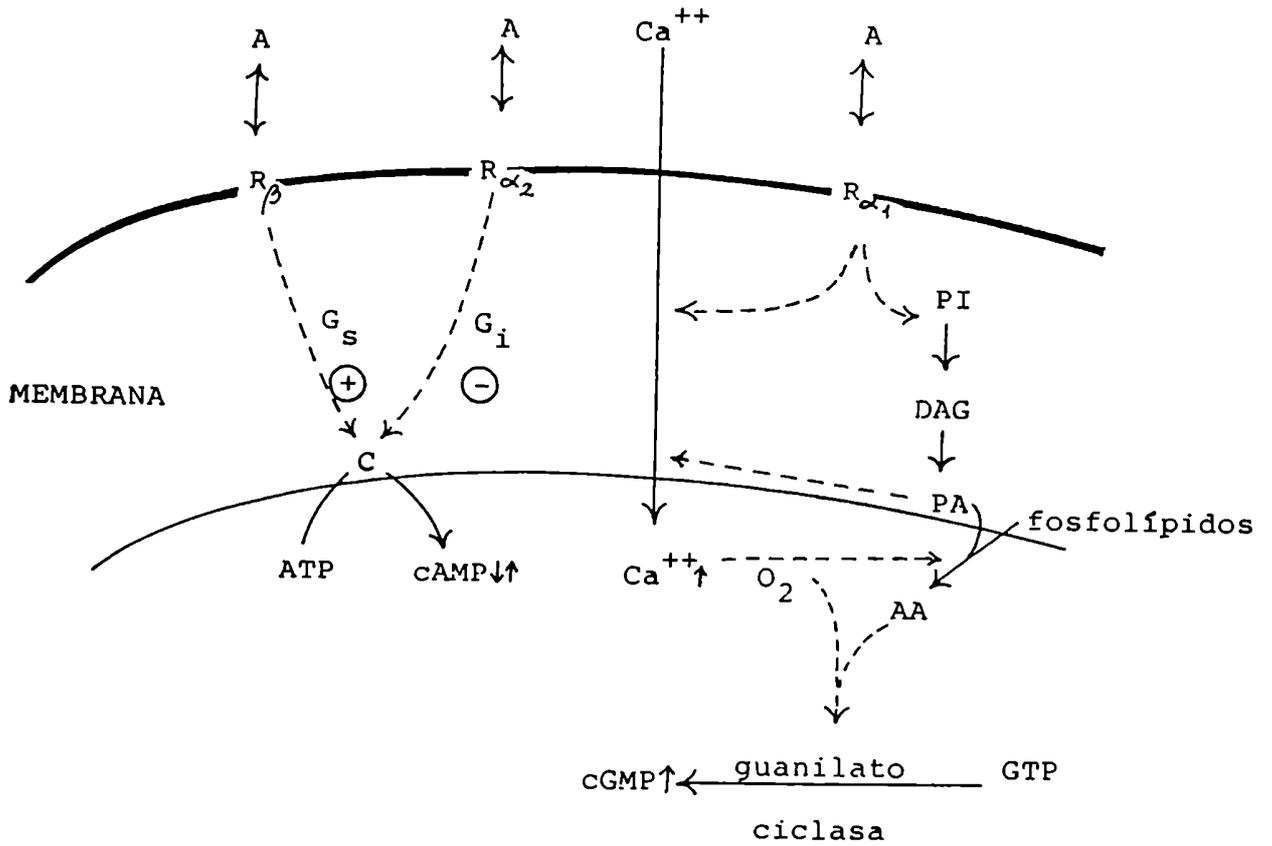
Otro grupo de receptores y sus ligandos utilizan un sistema de transducción de señal dependiente del Ca^{2+} intracelular. Los ligandos que emplean esta vía hidrolizan fosfoinosítidos de la membrana (147, 148). Los llamados fosfoinosítidos son 3 fosfoli-

pidos aniónicos: el fosfatidil inositol (PI) a partir del que se forma el fosfatidil inositol 4-fosfato (PIP) y luego el fosfatidil inositol 4,5-difosfato (PIP₂) por fosforilaciones sucesivas catalizadas por quinasas. Las reacciones son reversibles en presencia de monoesterasas (FIGURA 8). Como estos ciclos funcionan continuamente, la cantidad de PIP₂ presente en la membrana es sumamente pequeña (149).

Al ser ocupado el receptor, actuaría un mecanismo de acople a través de proteínas (148) análogo al del sistema de la adenilato ciclasa estimulando una fosfodiesterasa: la fosfolipasa C (PL C) (150). Esta enzima, ubicada en la membrana, cataliza la hidrólisis del PIP₂ a diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). Este punto de bifurcación da origen a 2 productos que funcionan como segundos mensajeros y que disparan 2 vías paralelas que actúan conjuntamente para llegar a la respuesta fisiológica (FIGURA 9) (151). El diacilglicérido (DAG) activa a su vez una quinasa: la proteína quinasa C (PK-C). En una reacción catalizada por otra quinasa, el DAG da origen al ácido fosfatídico a partir del cual se produce la liberación de AA con la consiguiente formación de sus metabolitos de oxidación que pueden estimular la guanilato ciclasa (152). Se produce entonces un incremento en la concentración de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). El ácido fosfatídico por otra parte puede combinarse con trifosfato de citidina (CTP) para dar CDP-diacilglicerol que es capaz de formar nuevamente PI al reaccionar con inositol cerrando un ciclo.

FIGURA 7:

Esquema de acción de segundos mensajeros para receptores adrenérgicos



- A= agonista adrenérgico
- G_s = proteína G estimuladora
- G_i = proteína G inhibidora
- PA= ácido fosfatídico
- C= unidad catalítica de la adenilato ciclasa

FIGURA 8:

Ciclo del fosfatidil inositol

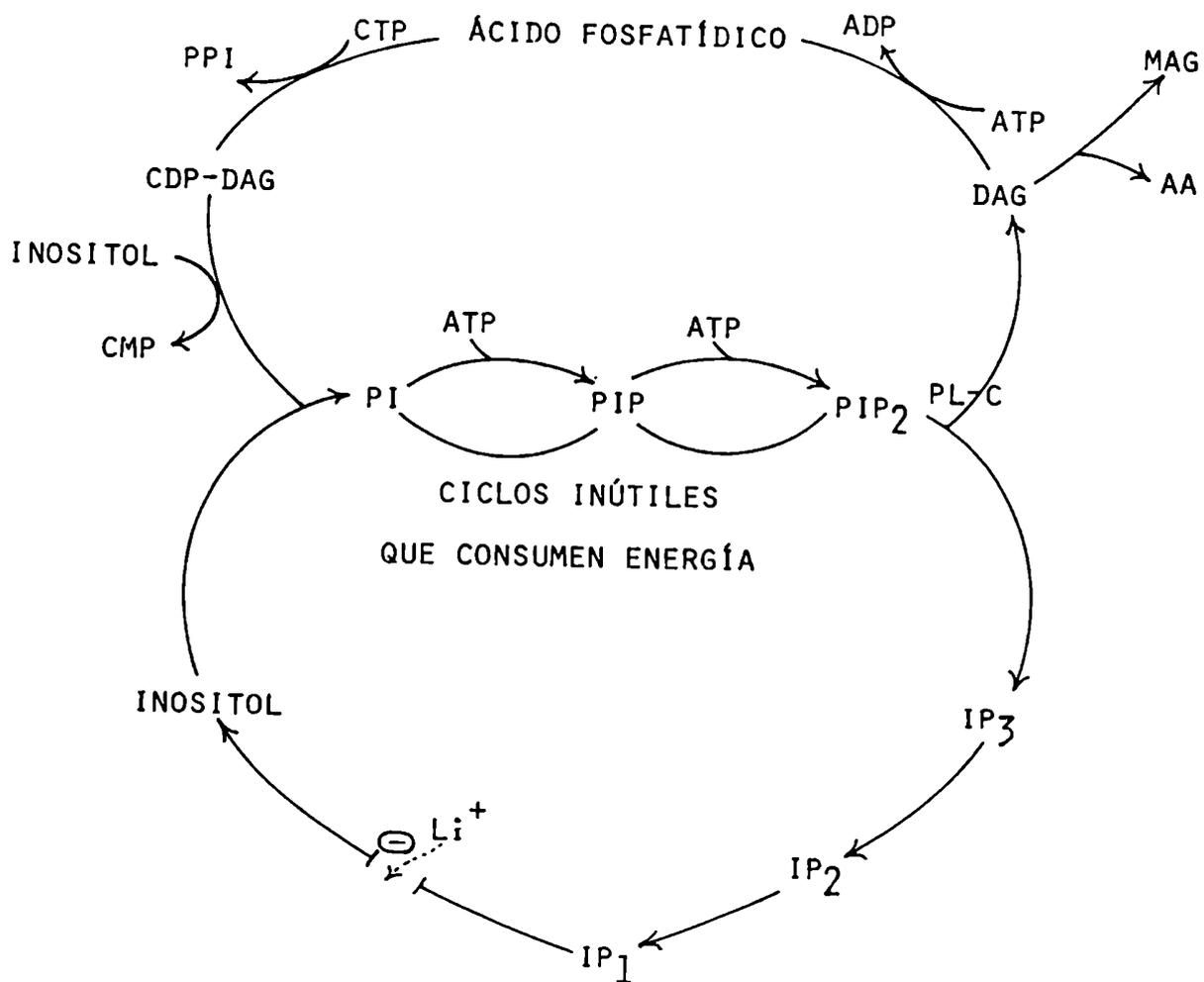
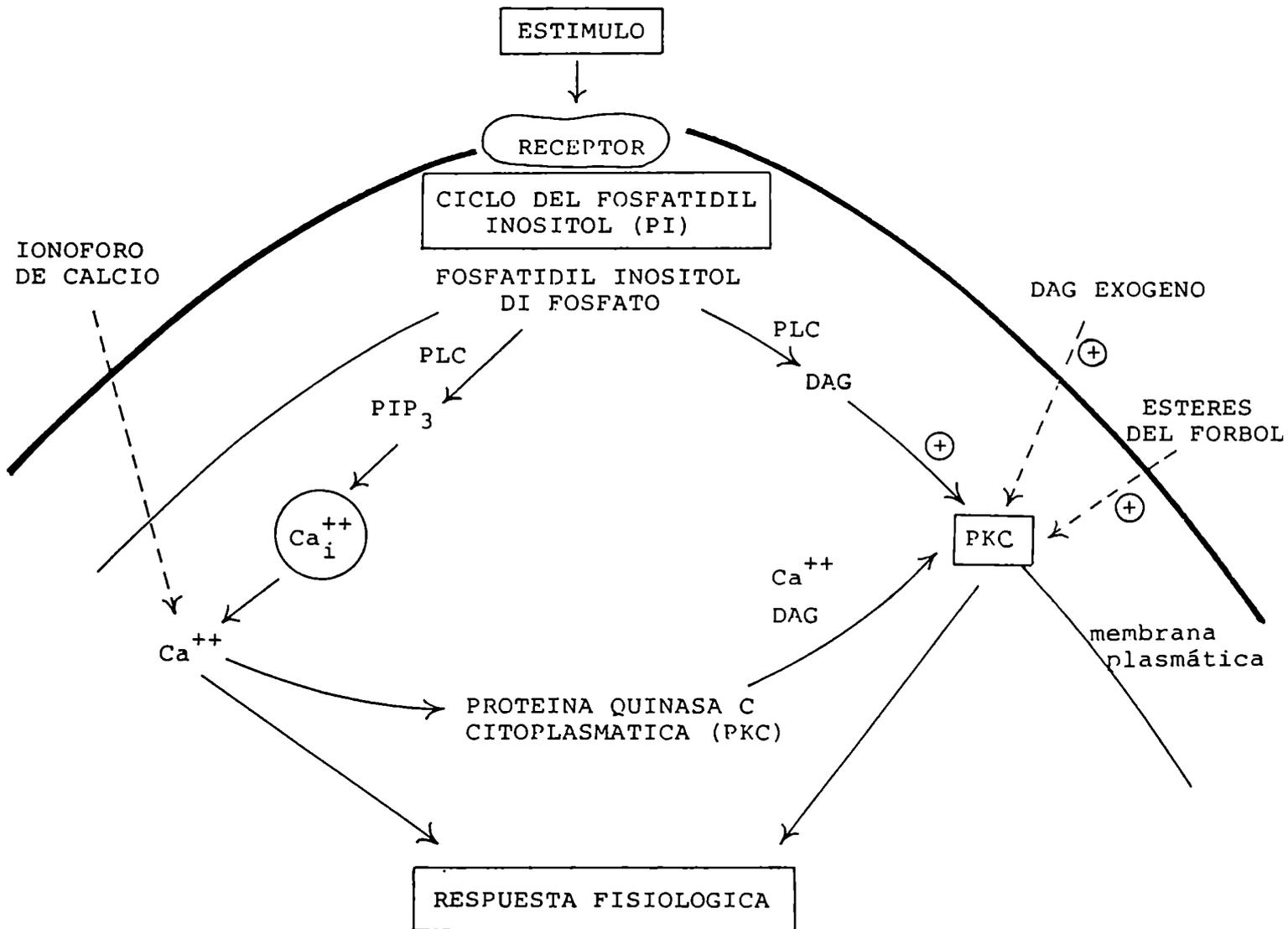


FIGURA 9:

Modelo de transducción de señal y acontecimientos intracelulares en linfocitos T después de la estimulación



El inositol por su parte proviene de la defosforilación en 2 etapas catalizada por fosfatasas a partir del IP_3 . La enzima inositol 1-fosfatasa es muy sensible a la inhibición por litio (149), por lo que en presencia de este catión se acumula IP_3 .

Entonces se pueden describir 4 ciclos metabólicos asociados a la transducción de señales a través de fosfoinosítidos: 2 ciclos productivos interconectados para formar PI y 2 ciclos improductivos que consumen parte del PI. El punto clave del mecanismo de transducción es la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-difosfato, paso en el que se bifurca la señal produciendo los 2 compuestos que actúan como segundos mensajeros (FIGURA 8). Los niveles intracelulares de DAG e IP_3 surgen del balance entre su producción y su consumo (FIGURA 8) .

El DAG activa la proteína quinasa C aumentando su afinidad por Ca^{2+} e induciendo su translocación del citosol a la membrana plasmática (153, 154).

El IP_3 actúa liberando Ca^{2+} de depósitos intracelulares (155), probablemente del retículo endoplasmático, aumentando así la concentración de Ca^{2+} libre intracelular (156). Esto a su vez puede activar quinasas dependientes de Ca^{2+} llevando a la fosforilación de proteínas. El aumento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático actúa sinérgicamente con la PK-C activada por el

DAG conduciendo a la respuesta final (157).

Los promotores tumorales, tanto los ésteres del forbol (150, 154) como la teleocidina (158, 159) se unen irreversiblemente a la PK-C activándola. Recientemente se ha demostrado que la PK-C es el receptor celular para la mayoría de los promotores tumorales (150, 154). Así es posible disociar experimentalmente la activación de esta enzima del efecto del Ca^{2+} (160).

El IP_3 puede sustituirse experimentalmente por un ionóforo de calcio aunque como la actividad de la PK-C depende de la concentración de Ca^{2+} intracelular, si el incremento del catión es suficientemente grande también puede activar la quinasa. Esto podría explicar la capacidad de ionóforos del calcio de inducir proliferación celular. Precisamente se ha observado (160) que mediante ionóforos de calcio y ésteres de forbol agregados en forma conjunta puede simularse la activación linfocitaria mediada por antígenos y mitógenos.

La proteína quinasa C es una enzima que fue descubierta por Y.Nishizuka (147, 161) y que se encuentra en muchos tejidos. Al activarse aumenta su afinidad por Ca^{2+} y forma un complejo cuaternario del que participan la enzima, DAG, un fosfolípido (el más efectivo es la fosfatidilserina) y Ca^{2+} . Como no todos los fosfolípidos inducen el mismo nivel de actividad, la activación de la enzima depende también de la distribución de éstos en la membrana. La PK-C fosforila un amplio rango de proteínas tanto in vivo como en sistemas libres de células (162, 163). Entre sus sustratos se encuentran proteínas integrales de la membrana

linfocitaria tales como el receptor para interleuquina 2 (164, 165), antígenos de histocompatibilidad de clase I, la llamada T200, una glucoproteína que abunda en la superficie de células mieloides y linfoides (166) y el complejo CD3 en el que fosforila la cadena gamma y en menor proporción la cadena delta (167).

Al agregar IL-2 a la línea de cultivo CTLL (cuyo crecimiento depende de esta linfoquina) se produce activación y translocación de la PK-C a la membrana (168) pero no se sabe si esto puede ser extrapolado a la secuencia de activación normal por antígeno. En este sentido, dos trabajos recientes (169, 170) estudiando la activación celular en un clon de linfocitos T citotóxicos murinos estimulados por antígeno encuentran una etapa dependiente del ciclo del PI y otra, la de respuesta a la IL-2, independiente de este metabolismo. La regulación de fenómenos dependientes de IL-2 por PK-C se produce no sólo a través de la fosforilación de su receptor sino también por la inducción del ARN mensajero para este receptor (171).

Además la PK-C sería la responsable de la alcalinización que se observa cuando se activan los linfocitos y otros tipos celulares (146). La enzima podría fosforilar el intercambiador Na^+/H^+ de la membrana, produciendo así un aumento del pH intracelular (172). Varios de los cambios metabólicos descritos anteriormente como consecuencia de la activación linfocitaria, dependen directamente de la PK-C por ejemplo el transporte de glucosa, el aumento de la glucólisis y el de la actividad de ornitina decarboxilasa (173). Precisamente la ornitina y la putrescina aumen-

tan la producción de IL-2 pero inhiben la activación de linfocitos T in vivo e in vitro (173). También es a través de la PK-C que se regula la expresión de algunos antígenos de membrana asociados a la activación (173). Ejerce una regulación negativa induciendo una menor expresión de receptores para antígeno (173).

Las subpoblaciones T tendrían requerimientos diferentes para expresar sus funciones a pesar de utilizar el mismo mecanismo de transducción. Así, la inducción de la producción de IL-2 por linfocitos T_H requiere un alto grado de actividad de la PK-C que no puede obtenerse sólo a partir de la unión del antígeno con su receptor. Las células accesorias compensan de algún modo esta insuficiencia, probablemente suministrando un estímulo adicional (174).

Estos mecanismos que controlan la proliferación de células normales serían también responsables del crecimiento de células tumorales. En efecto, se observó que proteínas codificadas por oncogenes actúan sobre el mecanismo dependiente del PI llevando a proliferación celular (175, 176). Además se ha observado que durante el proceso de activación linfocitaria se produce la expresión transitoria de oncogenes tales como c-fos y c-myc (177, 178) y se ha sugerido (178) que la PK-C es la que regula los niveles de los ARN mensajeros correspondientes.

MODELO DE SENSIBILIZACION IN VIVO:

Reacción de aurícula aislada de rata con linfocitos de pacientes chagásicos :

En el modelo de activación in vivo se emplearon como células efectoras linfocitos de pacientes chagásicos crónicos. En esta infección parasitaria se supone que los linfocitos se encuentran sensibilizados contra el agente infeccioso y contra antígenos cardíacos. Entonces se enfrentaron estas células efectoras con la preparación de aurícula aislada de rata y se estudió la reacción, se identificó la población efectora y algunos de los metabolitos responsables del efecto observado.

Respuesta inmune en la enfermedad de Chagas:

La enfermedad de Chagas o Trypanosomiasis americana es una patología endémica en vastas zonas del continente americano incluyendo nuestro país (179). Es provocada en seres humanos y mamíferos por el Trypanosoma cruzi (180). En Argentina en la forma crónica de la enfermedad de Chagas se presentan lesiones en corazón, músculo esquelético y sistema nervioso. La cardiopatía

es la manifestación más frecuente. Se presenta varios años después de la infección y evoluciona lenta y progresivamente con trastornos de conducción eléctrica y arritmias.

El *T. cruzi* se transmite a través de las heces de la vinchuca, insecto vector, ingresando al organismo por vía cutánea o mucosa. Se disemina a través de la sangre o linfa llegando a distintos órganos, preferentemente corazón, sistema nervioso, músculos, sistema reticuloendotelial y aparato digestivo. El parásito (forma amastigote) se multiplica intracelularmente en el huésped, por división binaria. Al destruirse la célula huésped, el protozoo pasa a circulación sanguínea o al líquido intersticial. A través de la sangre, los parásitos llegan a diversas partes del organismo afectando preferentemente ciertos tejidos como el músculo cardíaco y el sistema nervioso. Los estudios histopatológicos revelan diversas lesiones en músculo cardíaco. La característica miocardiopatía chagásica presenta consistentemente infiltrados de células mononucleares que generalmente no están asociados a nidos de amastigotes (181).

El sistema inmune del huésped actúa desde el comienzo de la invasión parasitaria, controlando luego la parasitemia y llevando la relación huésped-parásito a un balance tal que la infección se hace crónica (182).

Los estudios realizados en seres humanos infectados muestra-

ron que se produce una fuerte respuesta humoral y celular, y que actúan mecanismos regulatorios para mantener la respuesta en niveles estables (183).

Aún hoy se discute si la respuesta inmune del huésped desencadena la patología crónica en la enfermedad de Chagas. Algunos autores consideran que las evidencias en favor de la autoinmunidad son circunstanciales por las condiciones de los ensayos realizados (184). Varios investigadores estudiaron la posible participación de mecanismos inmunopatológicos mediados por linfocitos en la génesis de la cardiopatía chagásica. Los linfocitos sensibilizados reconocerían antígenos de la célula cardíaca de reacción cruzada con antígenos parasitarios. Esta podría ser la causa de la destrucción de la célula blanco. Algunos trabajos sugieren que los linfocitos chagásicos poseen reactividad contra Trypanosoma cruzi y antígenos de corazón medible, por ensayos de inhibición de la migración leucocitaria (185, 186). Además se ha postulado la presencia de fenómenos autoinmunes que involucran la producción de autoanticuerpos y la reacción de los mismos con antígenos tisulares (187). Por otro lado se ha logrado producir una cardiopatía experimental inoculando antígenos del Trypanosoma cruzi, en ausencia de infección (188).

En el suero de pacientes chagásicos crónicos se detectaron, por inmunofluorescencia, anticuerpos llamados "EVI" que reaccionaban con endocardio, endotelio vascular e intersticio en cortes de corazón (189, 190). Estos anticuerpos estaban presentes en la forma aguda y crónica de la enfermedad. Se observó que los anti-

cuerpos reconocían antígenos del Trypanosoma cruzi y Trypanosoma rhodeniense (191) y con la vaina de Schwann de nervios periféricos (192). Más recientemente se comprobó que la imagen descrita para la reactividad EVI correspondía a dos especificidades diferentes: una imagen extracelular de reacción heteróloga y una intracelular de actividad homóloga (193, 194). Se describió además la presencia de inmunoglobulina G en el suero de estos enfermos que reacciona con receptores β adrenérgicos de corazón de rata (195, 196, 197) y de cobayo y pueden interactuar con el complejo receptor-adenilato ciclasa, activando esta enzima (198). Este anticuerpo es independiente del anticuerpo EVI. No se sabe si este tipo de anticuerpos reacciona además con determinantes antigénicos linfocitarios. Todos estos anticuerpos podrían alterar tanto la función de los órganos "blanco" de la enfermedad de Chagas crónica, como la de otras células portadoras de los antígenos relevantes.

Por otro lado en ciertas patologías autoinmunes se observó que las células del órgano involucrado aumentan la expresión de antígenos de histocompatibilidad. Factores solubles tales como el interferón aumentan su expresión y otros como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) la disminuyen (199). En el caso de la enfermedad de Chagas, podría ocurrir que la infección induzca en el tejido cardíaco una mayor expresión de antígenos de histocompatibilidad. Así, la reactividad biológica de ciertos subgrupos de linfocitos puede no sólo ser interpretada como resultado del reconocimiento antigénico específico sino también como fruto

de un estado de activación celular diferente del de reposo.

En todo caso, independientemente de los mecanismos que determinen la presencia del infiltrado mononuclear en el corazón de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica (autoinmunidad?, mecanismos inespecíficos?) es de interés estudiar cómo las células mononucleares pueden afectar el comportamiento del tejido cardíaco.

MODELO DE ACTIVACION IN VITRO:

Reacción de aurícula aislada de rata con linfocitos humanos normales estimulados por lectinas o un ionóforo de calcio:

En el modelo de activación in vitro se utilizaron linfocitos periféricos humanos normales estimulados con PHA, lectina mitogénica, en la mayoría de los experimentos, o bien con WGA, lectina no mitogénica, o el ionóforo de calcio A23187 en los casos restantes. Se enfrentaron las células o sobrenadantes producidos por ellas con el tejido auricular. Se estudió el efecto producido, el tipo de células responsables y el mecanismo de acción.

Para la estimulación linfocitaria con estos agentes es válida la descripción hecha más arriba en forma general.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1) Células efectoras:

Las células mononucleares periféricas de dadores normales y pacientes chagásicos se obtuvieron por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque (200) a partir de sangre desfibrinada recién extraída.

Brevemente, se diluyó la sangre 1:2 con solución fisiológica y se siembra sobre Ficoll-Hypaque (densidad= 1,077) en relación 3 a 1 (v:v). Se centrifugó a 400 x g durante 45 minutos y se obtuvo la fracción de células mononucleares en la interfase, quedando los polimorfonucleares y los glóbulos rojos en la parte inferior de los tubos.

Se separó la interfase y se lavó 3 veces con medio de cultivo libre de suero o con solución fisiológica y finalmente se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco Lab, USA) conteniendo 10% de suero fetal bovino inactivado por calentamiento a 56° C durante 30 minutos (SFB) (Gibco Lab, USA) y 50 ug/ml de gentamicina (Schering Co, Essex, Argentina) (RPMI-SFB), a una concentración de 8×10^6 células /ml.

Las células se incubaron en estufa gaseada con 5% CO₂ a 37° C por los tiempos indicados en cada caso.

1.1- Separación de distintas poblaciones celulares:

1.1.a. Eliminación de células adherentes:

Para eliminar las células adherentes y monocitos, la suspensión de células mononucleares periféricas se incubó con un volumen igual de una suspensión de limaduras de hierro (Lymphocyte separating reagent, Technicon Inst. Corp., Tarrytown, N. York, USA). Posteriormente se centrifugó en gradiente de Ficoll-Hypaque (400 x g, 15 min) eliminando así las células que fagocitaron las partículas de hierro y las células muertas. Alternativamente, las células mononucleares se incubaron durante 18 horas sobre superficies plásticas (adherencia a plástico). Se obtuvo así una suspensión de linfocitos (L) que contenía una contaminación de monocitos menor del 1%, determinado por tinción con peroxidasa.

1.1.b. Formación de rosetas con eritrocitos de carnero:

Los linfocitos se fraccionaron por la capacidad de formar rosetas con glóbulos rojos de carnero (rosetas E) (5). Se utilizó sangre ovina anticoagulada de origen comercial. .

Se lavaron las células 3 veces con solución fisiológica resuspendiendo finalmente al 1% v:v en medio de cultivo. Esta suspensión se mezcló con igual volumen de la suspensión de L, se centrifugó a 400 x g 5 minutos y se dejó a 4° C durante 18 horas. Luego se resuspendió cuidadosamente y se sembró sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque. Se centrifugó 30 minutos a 400 x g en frío. Se obtuvieron las rosetas en el fondo de los tubos y las células que no formaron rosetas en la interfase. Se separaron ambas fracciones y se sometieron a lisis con una solución hipotó-

nica de LiNH_4 0,75% en solución tamponada de Tris 0,02M, pH 7,2 para eliminar los eritrocitos. Ambas fracciones se lavaron y se resuspendieron en RPMI-SFB.

Se obtuvieron así dos fracciones: una enriquecida en linfocitos T por su capacidad de formar rosetas E (ERFC) y otra no formadora de rosetas (no-ERFC) que comprende otras poblaciones como B, K, nulas y linfocitos de baja afinidad por E (5).

Se consideran rosetas cuando un linfocito tiene tres o más E adheridos a su membrana. Morfológicamente las poblaciones obtenidas correspondían en un 99% a linfocitos pequeños.

En todos los casos después de la última etapa de purificación, las células se lavaron 3 veces con medio de cultivo, se colorearon con colorante de Turk y se contaron en cámara de Neubauer. Finalmente, se resuspendieron a una concentración de 8×10^6 células/ml en RPMI-SFB y se mantuvieron en la estufa gaseada hasta ser utilizadas en los ensayos.

1.1.c. Viabilidad celular:

La viabilidad de las células después de purificadas o en presencia de los diversos inhibidores y drogas empleadas se verificó por el ensayo de exclusión de azul Trypan. Las células efectoras empleadas contenían siempre más de un 80% de células viables.

1.2. Pacientes:

Se estudiaron individuos con enfermedad de Chagas crónica, tanto con infección crónica por *Trypanosoma cruzi* sin síntomas clínicos de cardiomiopatía (n=9) como con cardiomiopatía chagásica crónica (n=12). Los pacientes habían residido en el Gran Buenos Aires, área no endémica, por un período mayor o igual que un año y fueron referidos por los Servicios de Cardiología del Hospital Ramos Mejía, del CEMIC o del Instituto de Cardiología (Fundación H. Pombo de Rodríguez) de la Academia Nacional de Medicina.

La sangre de individuos normales se obtuvo por punción venosa de donadores voluntarios adultos sanos. Cada experimento fue realizado con células provenientes de un donador diferente.

2) Preparación de aurícula aislada de rata:

Se sacrificaron ratas albinas macho de la cepa Wistar y 200-250 g de peso por decapitación. Se extrajo rápidamente el corazón y se colocó en una capsula de Petri conteniendo solución modificada de Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB). La solución que se mantuvo a 30° C gaseada con una mezcla de 95% O₂-5% CO₂, tenía la siguiente composición: Na⁺ 145,0 mM, K⁺ 6,0 mM, Ca²⁺ 1,22 mM, Mg²⁺ 1,33mM, PO₄³⁻ 1,2mM, Cl⁻ 125,0 mM, HCO₃⁻ 25,3 mM, SO₄²⁻ 1,33mM, glucosa 5,5mM.

Se separaron las aurículas de los ventrículos, se disecaron cuidadosamente y se suspendieron de un sostén de vidrio sumer-

giéndolas en un recipiente con 15 ml de la solución KRB equilibrada con la mezcla de gases ya nombrada y mantenida durante el experimento a 30° C y pH 7,4. Un extremo del tejido se sujetó a un sostén de vidrio y el otro a un transductor de fuerza (celda Stathan UC3-Gold) acoplados a un oscilógrafo escritor.

Luego de aplicar a las aurículas una tensión constante de reposo de 750mg a través de un dispositivo micrométrico, se estudió la actividad de las preparaciones aisladas que latían espontáneamente en función de la tensión contráctil isométrica efectiva por encima de la tensión de reposo. Esta variable tomada a partir de los registros del oscilógrafo se denominó tensión isométrica desarrollada (TID) y se midió en mg.

Las aurículas se dejaron equilibrar latiendo espontáneamente durante 60 minutos. El valor de la tensión contráctil registrado en ese momento se consideró como valor inicial (100%). Los valores experimentales y las variaciones inducidas por diversos agentes agregados se expresan como cambios porcentuales del valor inicial.

En forma análoga se analizó, cuando correspondía, el otro parámetro estudiado: la frecuencia de contracciones (FC) o número de ciclos contráctiles por minuto. También se expresan los cambios porcentuales respecto del valor inicial considerado como 100%.

Los valores iniciales fueron: para la tensión contráctil: 480 a 530 mg y para la frecuencia de contracciones: 130 a 150 latidos por minuto.

El ensayo biológico de la aurícula aislada de rata fue llevado a cabo en laboratorios del CEFAPRIN por la Dra Leonor Sterin-Borda.

3) Sobrenadantes de reacción de linfocitos con aurículas :

Se extrajo el corazón de ratas Wistar, se lavó con solución fisiológica y se separaron las aurículas. Estas se disgregaron finamente en torma manual. La suspensión obtenida tenía un peso húmedo de $41,6 \pm 3,8$ mg/ml con un contenido proteico de $1,7 \pm 0,5$ mg/ml.

Los sobrenadantes (SN) libres de células se obtuvieron por incubación de 5×10^6 L chagásicos o L normales con 0,5 ml del homogenato de aurícula de rata durante 90 minutos a 37° C. Luego se centrifugaron las mezclas de reacción durante 15 minutos a 500 x g. De modo análogo se obtuvieron los sobrenadantes controles de homogenato solo o de linfocitos solos. Todos los SNs se mantuvieron a -20° C hasta ser utilizados.

4) Sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de linfocitos activados:

Para obtener estos sobrenadantes se incubaron 8×10^6 L/ml a 37° C, en estufa gaseada con 5% CO₂ y humidificada, durante 30 minutos, 18 o 48 horas en RPMI-SFB conteniendo 1% de una dilución 1:100 de la solución madre de PHA-P (Difco Lab, USA) o 10

ug/ml de WGA. Luego se centrifugó a 800 x g durante 15 minutos.

Los sobrenadantes de estimulación de L con PHA, WGA o controles fueron utilizados inmediatamente después de esta separación.

El SFB fue requerido para tiempos de incubación mayores (48 horas) para preservar la viabilidad celular.

5) Ensayo de proliferación:

Se estudió el efecto de las lectinas incubando alícuotas de 200 μ l de una suspensión de 1×10^6 células/ml con 20 μ l de una dilución 1:100 de la solución madre de PHA-P o de 10 μ g/ml de WGA a 37° C en estufa humidificada y gaseada con 5% CO₂ durante 72 horas.

La reacción se efectuó por triplicado en placas de cultivo Falcon de 96 pozos.

Se midió la incorporación de timidina al ADN después de un pulso de 18 horas con 0,2 μ Ci de timidina tritiada (³H-T, NEN, USA, actividad específica 20,0 μ Ci/mmol).

Los ensayos se llevaron a cabo en presencia o ausencia de inhibidores en las concentraciones finales que se mencionan.

6) Cosecha y evaluación de los cultivos:

Se separaron las células por aspiración con corriente de vacío con un cosechador automático multicanal. Los linfocitos

fueron retenidos sobre filtros de fibra de vidrio. Los trozos de filtro correspondientes a cada pozo se colocaron en viales de centelleo y se les añadió solución centelleadora (PPO 5 g, dimetil-POP 250 mg, tolueno 1l, ácido acético 2 ml) y se contaron en contador de centelleo líquido para radiación beta.

7) Diálisis:

Los sobrenadantes de estimulación de L con PHA fueron dializados contra NaCl 0,15M (solución fisiológica) empleando un tubo de celulosa con un corte de 12000 daltons de peso molecular (250-9U, Sigma Chem.Co, USA).

8) Soluciones empleadas:

8.1. Solución de Turk para contaje de linfocitos:

Se prepara con: violeta de genciana 100 mg
ácido acético glacial 31,25 ml
agua destilada c.s.p. 500 ml

Las muestras se diluyen 1:20 con esta solución para lisis de los eritrocitos y colorear los leucocitos y se cuentan en cámara de Neubauer.

8.2. Solución para ensayo de viabilidad celular:

Solución A: azul trypan 0,14%
Solución B: cloruro de sodio 4,25%

Se mezclan 4 partes de A más 1 parte de B antes de usar. Se incubó la suspensión celular (8×10^6 células/ml) con el reactivo en una relación 1:10 durante 2 minutos y se cuenta.

Las células viables excluyen el colorante.

B.3. Lectinas:

Se empleó fitohemaglutinina (PHA), lectina de Phaseolus vulgaris tipo V (Sigma Chem.Co, USA) de modo de tener una concentración final de 10 ug/ml o posteriormente PHA-P (Difco Lab., USA) agregando un 1% de la solución madre.

Se utilizó también aglutinina de germen de trigo (WGA) (Sigma Chem.Co, USA) en una concentración final de 10 ug/ml.

B.4. Ionóforo de calcio:

El ionóforo de calcio A23187 se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10 mM. La concentración final de DMSO en el baño de reacción fue de 0,05% v:v y no afectó el comportamiento contráctil de la aurícula.

B.5. Araquidonato de sodio:

El araquidonato de sodio (AA) (Sigma Chem.Co, USA) se disolvió en agua a $1,8 \times 10^{-2}$ M y luego se utilizó en un rango de concentraciones finales de 0,66 a $1,98 \times 10^{-4}$ M.

B.6. Interleuquina 2 y anticuerpo anti-interleuquina 2:

Se empleó interleuquina 2 (IL-2) de dos fuentes:

IL-2 natural (IL-2n) libre de lectinas y de interferón (Electronucleonics, USA).

IL-2 recombinante (IL-2r) producida por levaduras (Genzyme Corp., USA).

Además se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-IL-2 (AcM anti-IL-2) (Genzyme Corp., USA) en una dilución 1:20.

8.7. Diacilglicérido sintético:

Se empleó 1-oleil,2-acetil-glicerol (OAG) (Sigma Chem.Co., USA) disuelto en DMSO y diluido en medio, como solución madre a una concentración de $1,25 \times 10^{-2} M$.

8.8. Inhibidores:

Se utilizaron soluciones recién preparadas de los siguientes reactivos:

- a) (-)-propanolol-HCl (Ayyerst Lab Inc, USA) $1 \times 10^{-7} M$
- b) cicloheximida (Sigma Chem Co, USA) 10^{-4} - $10^{-7} M$
- c) ácido acetilsalicílico (ASA) (Sigma Chem Co, USA) $1,8 \times 10^{-2} M$
- d) indometacina (Merck, Sharp & Dohme, USA) $1 \times 10^{-4} M$
- e) ácido nordihidroguayarático (NDGA) (Sigma Chem.Co, USA)
 $1 \times 10^{-9} M$
- f) ácido 5,8,11,14-eicosatetraínoico (ETYA) (Hoffmann-Laroche, Suiza) $1 \times 10^{-7} M$
- g) 7-[3-(4-acetil-3-hidroxi-2-propil-fenoxi)-2-hidroxi-propoxi]-4-oxo-8-propil-4 H-1-benzopirano-2 carboxilato de sodio (FPL 55712) (Fisons Ltd, UK) $1 \times 10^{-7} M$

- h) dexametasona (Merck, Sharp y Dohme, USA) 1×10^{-6} M- 1×10^{-7} M
- i) ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) (Sigma ChemCo, USA) 1×10^{-2} M (sal disódica)
- j) verapamil (Sigma ChemCo, USA) 10^{-5} M
- k) 2-nitro-carboxifenil, NN-difenil carbamato (NCDC) (Sigma ChemCo, USA) 5×10^{-4} M.

La solución madre de indometacina se preparó en solución tamponada de fosfatos 0,1M a 1 mg/ml. La dexametasona, el verapamil y el NCDC se disolvieron en alcohol etílico absoluto y se diluyeron con solución fisiológica. El NDGA y el ETYA se disolvieron en un pequeño volumen de DMSO y se llevaron a la concentración deseada con solución fisiológica. La solución madre de FPL 55712, de EGTA y de ASA se prepararon en agua destilada.

Todas las concentraciones mencionadas salvo la de soluciones madre se refieren a las finales en el medio de reacción.

A las concentraciones empleadas, ninguna de las drogas afectó la viabilidad de los linfocitos ni produjo efectos per se sobre la preparación de aurícula aislada de rata.

9) Expresión de los resultados:

Todos los resultados se expresan como la media \pm el error standard de la misma.

Las curvas dosis-respuesta se construyeron de acuerdo al método de van Rossum (201) que emplea dosis acumulativas agregadas en alícuotas fijas.

Para el caso de los linfocitos, el intervalo de tiempo entre dos agregados sucesivos fue el requerido para obtener un efecto máximo, sostenido por un mínimo de tres minutos.

RESULTADOS

MODELO DE SENSIBILIZACION IN VIVO

1) Efecto de los linfocitos de pacientes chagásicos sobre la contractilidad de la aurícula de rata

Se comparó el efecto de distintas concentraciones de linfocitos de pacientes chagásicos y de dadores normales sobre la preparación de aurícula aislada de rata.

Como se puede observar en la Figura 10 las células de los pacientes estimulan notoriamente la tensión y frecuencia de contracciones en concentraciones mayores que 4×10^4 células/ml. Los controles no afectan ninguno de los dos parámetros estudiados: tensión y frecuencia.

Cuando se enriqueció la suspensión celular derivada de los pacientes en linfocitos T (Tch) por formación de rosetas E, la estimulación de la tensión y frecuencia de contracciones fue aún mayor que con la totalidad de los linfocitos (Lch) para igual número de células. En cambio, al emplear las células no formadoras de rosetas E (no Tch), se observó una disminución de la tensión y frecuencia contráctil respecto de los valores basales.

Como puede observarse en la Figura 11 todos estos efectos, tanto el estimulante de los linfocitos chagásicos (Lch) totales y de los enriquecidos en linfocitos Tch, como el depresor de las células no Tch aparecen gradualmente y aumentan hasta llegar a un

valor de "plateau" aproximadamente a los 30-40 minutos de reacción.

La Figura 12 muestra un trazado representativo de la frecuencia y tensión de contracciones de la aurícula aislada de rata antes del agregado de L ch y después de 5, 10 y 20 minutos del agregado de estas células. Puede observarse el incremento gradual de la tensión y frecuencia de contracciones luego del agregado de la suspensión celular.

2) Mecanismo de la reacción

Diversos caminos metabólicos llevan a la producción de sustancias capaces de estimular la frecuencia y tensión de contracciones de la aurícula de rata. Por este motivo se recurrió al empleo de inhibidores para tratar de identificar el mecanismo desencadenado por los linfocitos de enfermos chagásicos.

El efecto estimulante no desaparece en presencia del antagonista β adrenérgico (-)-propranolol 1×10^{-7} M (TID (%) = $-2,7 \pm 0,5$; F.C. = $-4,3 \pm 0,8$, n=3).

En cambio, utilizando inhibidores del metabolismo oxidativo del ácido araquidónico (AA) se observó que si se impedía la acción de la ciclooxigenasa con indometacina o ácido acetilsalicílico, el efecto inotrópico y cronotrópico positivo se hacía mayor. Por el contrario con inhibidores de la vía de la lipoxigenasa, NDGA y ETYA, se eliminó el efecto estimulante de la tensión y frecuencia. Con FPL 55712, antagonista de la sustancia

de reacción lenta de anafilaxia (SRS-A) también se anuló el efecto de estimulación (Figura 13).

3) Papel de factores solubles en la reacción:

Con el fin de averiguar si para lograr la estimulación de la tensión y la frecuencia en la aurícula era necesario el contacto entre el tejido cardíaco y los linfocitos de pacientes chagásicos durante el bioensayo, se utilizó el siguiente protocolo experimental (FIGURA 14): se incubaron los leucocitos mononucleares con un homogenato de aurícula de rata (HAR) durante 90 minutos. Luego se centrifugó y los sobrenadantes (SNs) libres de células se enfrentaron con la preparación de aurícula aislada.

Como puede observarse en la TABLA 1 los sobrenadantes de Lch que reaccionaron con HAR contienen factores solubles capaces de estimular la contractilidad cardíaca in vitro. Los valores obtenidos son menores que cuando se utiliza la suspensión de Lch (FIGURA 10). En el caso de la suspensión celular, para cantidades de linfocitos similares (4×10^6) el cambio de tensión producido superó el 100% y el de frecuencia el 30%). El estímulo aportado por el homogenato de aurícula fue necesario ya que los sobrenadantes de Lch no estimulados con HAR no dieron estimulación.

En base a los resultados obtenidos con Lch se plantearon las siguientes interrogantes:

- La reactividad de Lch con la preparación de aurícula aislada es propia y exclusiva de esta enfermedad?, o, por el contrario,
- es posible lograr mediante manipuleo de laboratorio que los linfocitos humanos normales reaccionen con el corazón reproduciendo los efectos observados directamente con las células de pacientes chagásicos?

Fara responder estos interrogantes, se repitieron los ensayos utilizando linfocitos normales estimulados inespecíficamente con PHA.

MODELO DE ACTIVACION IN VITRO:

1) Efecto de los linfocitos activados con PHA sobre la contractilidad de aurícula aislada de rata

Como se demostró anteriormente los linfocitos de dadores normales no alteran el comportamiento contráctil de la aurícula.

Para estudiar si la estimulación inespecífica de los linfocitos modificaba su comportamiento cuando se los enfrentaba con el tejido cardíaco, se agregó una lectina, PHA 10 ug/ml c.f., en el baño de reacción simultáneamente con las células.

La Figura 15 muestra claramente que mientras los linfocitos y la PHA por separado son incapaces de producir modificación alguna, al agregar la PHA en presencia de estas células se produce un efecto cronotrópico e inotrópico positivo, que aumenta con el tiempo.

El desarrollo gradual del efecto estimulante con el esquema experimental empleado (FIGURA 15) depende del tiempo necesario para que la PHA se una a las células efectoras y las estimule así como del requerido para que la aurícula manifieste su respuesta .

El efecto estimulante depende de la concentración de L-PHA

agregados al sistema y es muy evidente a partir de 4×10^3 células/ml (FIGURA 16).

2) Células efectoras

Para determinar cuáles son los L responsables de la actividad estimulante, se separaron poblaciones por formación de rosetas E. Después del fraccionamiento en células formadoras de rosetas (población enriquecida en linfocitos T) y no formadoras de rosetas, se verificó la eficiencia de la separación probando la capacidad de las células de cada fracción de formar nuevamente rosetas E. Se obtuvieron los valores que figuran en la TABLA 2. Estos porcentajes son los esperados pues se sabe que luego de la lisis osmótica con NH_4Cl no todos los linfocitos que formaron rosetas E son capaces de unirse nuevamente a los glóbulos rojos.

Luego de su reacción con la PHA, las fracciones obtenidas tuvieron efectos opuestos sobre la preparación auricular: la población enriquecida en células T estimuló la tensión y frecuencia de contracciones mientras que la población deplecionada de células T, compuesta por células B, nulas, K, T con baja afinidad por E y monocitos contaminantes tenía un efecto inotrópico negativo sin alterar la frecuencia.

3) Mecanismos de reacción

Distintos compuestos son capaces de estimular la contractilidad cardíaca. Como en el modelo de activación in vivo, para estudiar el mecanismo de la reacción recurrimos al empleo de varios inhibidores en concentraciones que por sí mismas no afectan los parámetros de la contractilidad cardíaca ni la viabilidad de los linfocitos (TABLA 4).

En la TABLA 5 se presentan los resultados de la acción de estos inhibidores sobre la estimulación provocada en la aurícula por L + PHA. La reacción no fue inhibida por el antagonista β adrenérgico propanolol. Tampoco los inhibidores de la ciclooxygenación del AA (indometacina o ASA) anularon el efecto, más aún acentuaron la estimulación. Empleando inhibidores de la lipoxigenación del AA como NDGA y EIYA se eliminó el efecto estimulante. También por preincubación de las aurículas con el FPL 55712, inhibidor de la sustancia de reacción lenta de la anafilaxia, se bloqueó la acción de L + PHA.

A partir de estos resultados podemos concluir que el mecanismo por el cual los L tratados con PHA actúan sobre la aurícula involucra la liberación de metabolitos del AA, principalmente por la vía de las lipoxigenasas. Los incrementos observados con inhibidores de la ciclooxygenasa se deberían a que al bloquear esta vía enzimática habría más AA disponible para la lipoxigenación.

4) Efecto de linfocitos tratados con ionóforo de calcio

Como el efecto inotrópico y cronotrópico positivo podía observarse con tiempos cortos de exposición de los L a la PHA (10-40 minutos, FIGURA 15), se consideró la posibilidad de que pudieran estar involucrados acontecimientos tempranos de la acción de la lectina. Entre ellos (ver Introducción) se cuenta la movilización de Ca^{2+} . El ionóforo de calcio A23187 cuando se emplea en un rango adecuado de concentraciones reproduce algunos de los pasos iniciales de la activación de linfocitos T por lectinas, tales como incremento de la concentración de calcio intracelular, aumento del recambio de fosfolípidos y blastogénesis (5b).

Como puede observarse en la FIGURA 17 los linfocitos tratados con A23187 presentan un efecto estimulador de la tensión y la frecuencia de contracciones similar al observado con L + PHA (FIGURA 15). Los linfocitos solos o el ionóforo de calcio en la concentración utilizada no afectan en modo alguno la contractilidad cardíaca.

En resumen:

Los experimentos realizados con el modelo de activación in vitro, que han sido descritos en los puntos 1 al 4, demuestran que es posible imitar la acción que tienen espontáneamente los Lch por estimulación de linfocitos normales con PHA o A23187 y sugieren que la actividad desarrollada por los Lch es producto de su sensibilización in vivo.

Los estudios que se exponen a continuación se refieren al

mecanismo por el cual los linfocitos humanos normales activados in vitro pueden inducir cambios en la contractilidad de la preparación auricular.

5) Actividad presente en células y sus sobrenadantes después de un tiempo breve de exposición a la PHA

En la serie de experimentos anteriores se agregaban las células suspendidas en el medio en el que habían sido cultivadas.

Para definir si la actividad estudiada dependía del contacto entre las células y la aurícula o de factores solubles liberados al medio se utilizó un diseño experimental distinto (FIGURA 18). Brevemente, se estimularon los L con PHA y se separaron los sobrenadantes libres de células de los linfocitos por centrifugación. Luego, las células lavadas se incubaron por 2 horas y se utilizaron en el ensayo. Por otra parte, otra fracción de esos mismos linfocitos se reexpuso al estímulo de la PHA y se volvió a separar el sobrenadante de las células probando ambas fracciones en el ensayo. Con este esquema experimental fue posible además analizar la capacidad de linfocitos ya expuestos al estímulo para responder generando SNs activos frente a un segundo estímulo.

En todos los experimentos que siguen se tomaron los valores de tensión 10 minutos después del agregado de los reactivos al órgano aislado. Los sobrenadantes libres de células no produjeron cambios de la frecuencia cardíaca, por este motivo se con-

signará sólo la modificación de la tensión contráctil.

Se observó que al exponer las células a PHA por 30 minutos se encontró actividad estimulante tanto en los SNs como en las células. Cuando los L-PHA separados de su SN₁ y lavados se incubaron durante 2h a 37° C en medio de cultivo (en ausencia de lectina) y se probaron en el ensayo, perdieron su efecto sobre la contractilidad cardíaca y no lo recuperaron por nueva estimulación con PHA durante 30 minutos (FIGURA 19).

Al estudiar linfocitos después de 48h de estimulación con PHA, no se encontró actividad en las células ni pudo lograrse activación por nueva exposición a la lectina. Esto sugiere que la capacidad de los L de generar un efecto de estimulación de la tensión contráctil es agotable. Toda la actividad se encontró en el sobrenadante (FIGURA 19). La capacidad estimulante de los mismos fue superior a la de los SNs de 30 minutos de cultivo. Por su lado, los linfocitos cultivados en iguales condiciones pero en ausencia de lectina respondieron, como era de esperar, a la PHA.

6) Curva dosis-respuesta de sobrenadantes de activación de linfocitos normales con PHA

En la FIGURA 20 se muestra la curva dosis-respuesta para cantidades acumulativas de SNs obtenidos luego de distintos tiempos de estimulación. La actividad de los SNs dependió de la cantidad agregada y fue mayor cuanto mayor fue el tiempo de cultivo de los L con PHA.

La presencia continuada de la lectina durante el período total de generación del SN activo no parece ser necesaria ya que la actividad de SNs obtenidos a partir de linfocitos luego de 18 h de contacto con PHA, fueron lavados y cultivados por otras 18h en ausencia de lectina, fue similar a la observada en la FIGURA 20 (IDT (%) $24,7 \pm 8,6$; n=3).

7) Efecto de la diálisis:

La actividad de los SNs de estimulación con PHA obtenidos tanto a tiempos breves como prolongados de exposición se perdió por diálisis (TABLA 6). Se puede entonces deducir que entre los responsables del efecto estimulante de la contractilidad auricularse encuentra(n) uno o más compuesto(s) de bajo peso molecular.

En algunos casos (n=3) se intentó reconstituir el dializado agregando araquidonato de sodio (2×10^{-4} M c.f.) al baño de reacción. En esa concentración el araquidonato per se no modificaba el comportamiento auricular. Al añadirlo al sobrenadante dializado, se observó una recuperación parcial de la capacidad estimulante lo que permite inferir que el AA o alguno de sus metabolitos que pueda producirse catalizado por enzimas provenientes del tejido cardíaco estaría involucrado en la generación de la estimulación de la contractilidad.

8) Comparación del efecto de una lectina mitogénica, PHA, y una no mitogénica, WGA

Se estudiaron comparativamente dos lectinas, una mitogénica y otra no mitogénica. Los resultados demuestran que ambas fueron capaces de inducir sobrenadantes con actividad estimulante de la contractilidad cardíaca. En cambio, en el ensayo de proliferación, mientras que la PHA llevó a las células estimuladas a la división (incorporar timidina), la WGA no indujo blastogénesis (TABLA 7).

Estos resultados sugieren que la generación del efecto estimulante de la contractilidad no requiere la división celular. Estímulos insuficientes para inducir blastogénesis bastan para producir esta actividad.

Para estudiar el mecanismo de la reacción se analizó el efecto de diversas drogas que afectan distintas etapas de la activación linfocitaria. Todos estos reactivos fueron añadidos a los linfocitos antes de que se expusieran al estímulo de activación o durante el tiempo de activación y luego fueron lavados de manera que estuvieran ausentes durante el bioensayo o que su concentración final durante el mismo, al ser diluidos en el volumen del baño de reacción, fuera insuficiente para influir sobre el comportamiento contráctil.

9) Efecto de un inhibidor del flujo de Ca^{2+} y de un quelante catiónico sobre la generación de estimulación contráctil y proliferación celular inducidas por PHA

Se realizó el ensayo de estimulación con PHA en presencia de un bloqueante de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje: el verapamil, o en ausencia de Ca^{2+} colocando en el medio de reacción el quelante EGTA.

Como se muestra en la TABLA 8 el efecto sobre la contractilidad cardíaca no se generó en presencia de verapamil mientras que esta droga no afectó la división celular. En cambio, la ausencia de Ca^{2+} , ya sea llevando a cabo el ensayo en medio libre de este ión (datos no incluidos) o por el empleo de un quelante catiónico, impidió tanto la producción de la estimulación como la blastogénesis.

10) Efecto de glucocorticoides

Se empleó dexametasona en 2 concentraciones: 10^{-6} y 10^{-7} M y corticosterona 10^{-5} M.

La corticosterona, tal como describieron otros autores (202) inhibió la proliferación celular pero también impidió la generación del efecto de estimulación cardíaca (TABLA 9).

En cambio, la dexametasona en las concentraciones empleadas, impidió la producción de la actividad estimulante de la contractilidad sin afectar la proliferación linfocitaria (TABLA 9).

11) Efecto de la cicloheximida

Se estudió el efecto de la cicloheximida en un rango de concentraciones de 10^{-7} a 10^{-4} M. A molaridades altas este inhibidor impidió tanto la división celular como la aparición del estímulo de la contractilidad. En cambio, a bajas concentraciones no modificó la proliferación celular mientras que impidió la generación del efecto estimulante de la tensión contráctil auricular.

Cuando se quitó la cicloheximida por lavado, en particular para las concentraciones mayores es decir 10^{-4} y 10^{-5} M se recuperó la respuesta proliferativa casi totalmente pero la producción del efecto estimulante se recobró solamente en muy pequeña proporción (FIGURA 21).

12) a) Posibles productos de estimulación linfocitaria presentes en los sobrenadantes

Entre los numerosos compuestos generados por la activación linfocitaria se encuentran linfoquinas como la IL-2 y el IFN γ .

Se estudió la acción del IFN utilizando para ello interferón γ humano recombinante pero no se observó ningún efecto ni cuando se lo empleó solo ni en presencia de AA. Lo mismo se observó utilizando interferón α humano recombinante (Este inter-

ferón puede ser producido por leucocitos estimulados por PHA).

En cambio, la incubación de los sobrenadantes con un anticuerpo monoclonal anti-IL-2 (AcM anti-IL-2) resultó en una inhibición parcial del efecto (TABLA 10), lo que sugiere que el efecto de los SNs activos se debe en parte a la IL-2..

b) Efecto de la IL-2

Para verificar si la IL-2 era capaz de modificar el comportamiento de la aurícula in vitro, se ensayó esta linfoquina sola o en presencia de estímulos adicionales. Se pudo observar que, si bien no ejercía estimulación por sí misma, en presencia de AA en dosis subumbrales presentaba un efecto inotrópico positivo (TABLA 11).

Se empleó tanto IL-2 natural (IL-2n) obtenida por estimulación de leucocitos mononucleares periféricos humanos y libre de lectinas y de interferón, como IL-2 recombinante (IL-2r). En ambos casos pudieron observarse los mismos efectos. La molaridad final de IL-2r en el baño de reacción, considerando su actividad específica 5000 unidades/ug de linfoquina, resultó del orden de 10^{-11} M y correspondió a 1-3 unidades/ml. Preincubando tanto la IL-2r como la IL-2n con el AcM anti-IL-2 en concentraciones análogas a la que neutralizan el efecto de la IL-2 en cultivos, se anuló el efecto de estimulación de la contractilidad auricular. Estos resultados indican que la estimulación de la contrac-

tilidad era propia de la IL-2 y no se debía a otro producto presente en la preparación de IL-2n.

Se intentó ver si aumentando la dosis de IL-2 se evitaba el requerimiento cooperativo del AA. Para ello se dializó la solución de IL-2, que estaba en medio de cultivo, contra KRB y luego se añadió a la preparación auricular en cantidades de 63 a 111 unidades /ml (c.f.). En estas condiciones se observó un efecto inotrópico negativo directo: $IDT(\%) = -18 \pm 2$; $n=3$.

13) Curva dosis-respuesta de IL-2

Dejando constante la concentración de AA en $1,98 \times 10^{-4}M$ y agregando acumulativamente IL-2n en alícuotas de 10 μ l (1000 unidades/ml) observamos (FIGURA 22) que la tensión contráctil se incrementaba con la cantidad de IL-2n agregada hasta llegar a aproximadamente 2 unidades/ml, valor a partir del cual dejaba de aumentar. Cuando se empleó IL-2r se obtuvo una respuesta similar.

14) Efecto cooperativo del ionóforo de calcio y la IL-2

Como se describió en la INTRODUCCION la estimulación de la membrana celular, que induce un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, resulta en una mayor disponibilidad de AA.

Para estudiar el efecto del incremento de la concentración de este catión se utilizaron, en cooperación con IL-2n, bajas

dosis del ionóforo de Ca^{2+} A23187, tales que no modifican por sí mismas el comportamiento del tejido cardíaco (FIGURA 23). Los datos ilustrados en la FIGURA muestran que tanto el AA como el A23187 agregados en presencia de IL-2 inducen un efecto inotrópico positivo en la preparación auricular.

15) Posibles mecanismos involucrados en el efecto de la IL-2

Algunos investigadores (168) describieron que cuando la IL-2 interaccionaba con el receptor que expresan las células T activadas, se disparaba el ciclo del PI, catalizado por la fosfolipasa C (PL-C). Para saber si este mecanismo actúa en la estimulación de la contractilidad inducida por IL-2, utilizamos un inhibidor de la fosfolipasa C: el nitrocarboxifenil difenilcarbamato (NCDC). Como se muestra en la TABLA 12 el efecto sinérgico de la IL-2 tanto con el A23187 como con el AA no se manifestó en presencia de NCDC. Esto sugiere que el metabolismo del PI podría estar involucrado en la generación del efecto estimulante.

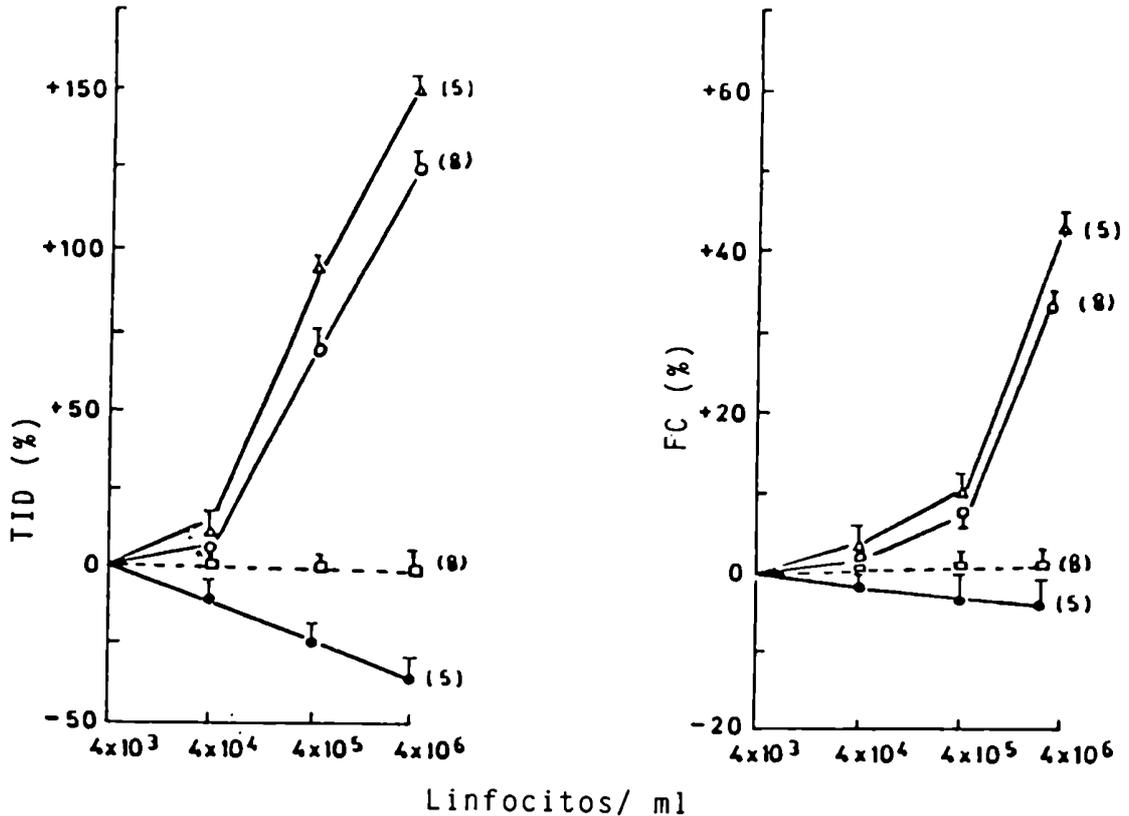
Como se describió en la INTRODUCCION, a partir del PI se forman diacilglicéridos que son capaces de activar directamente la PK-C. Para analizar la posibilidad de que en el sistema en estudio estén involucrados compuestos de este tipo, recurrimos al empleo de un diacilglicerol sintético: el 1-oleil, 2-acetilglicerol (OAG). Cuando se utilizó OAG en lugar de IL-2, se observó también un efecto sinérgico tanto con el AA como con el

A23187, que condujo a la estimulación de la contractilidad auricular. Sin embargo, este efecto no pudo ser inhibido con NCDC (TABLA 13).

Estos resultados sugieren que la IL-2 podría actuar suscitando la formación de diacilglicéridos. Esta hipótesis se valida cuando se suministra DAG exógeno ,que evita el requerimiento de su producción, y se repite el efecto.

FIGURA 10:

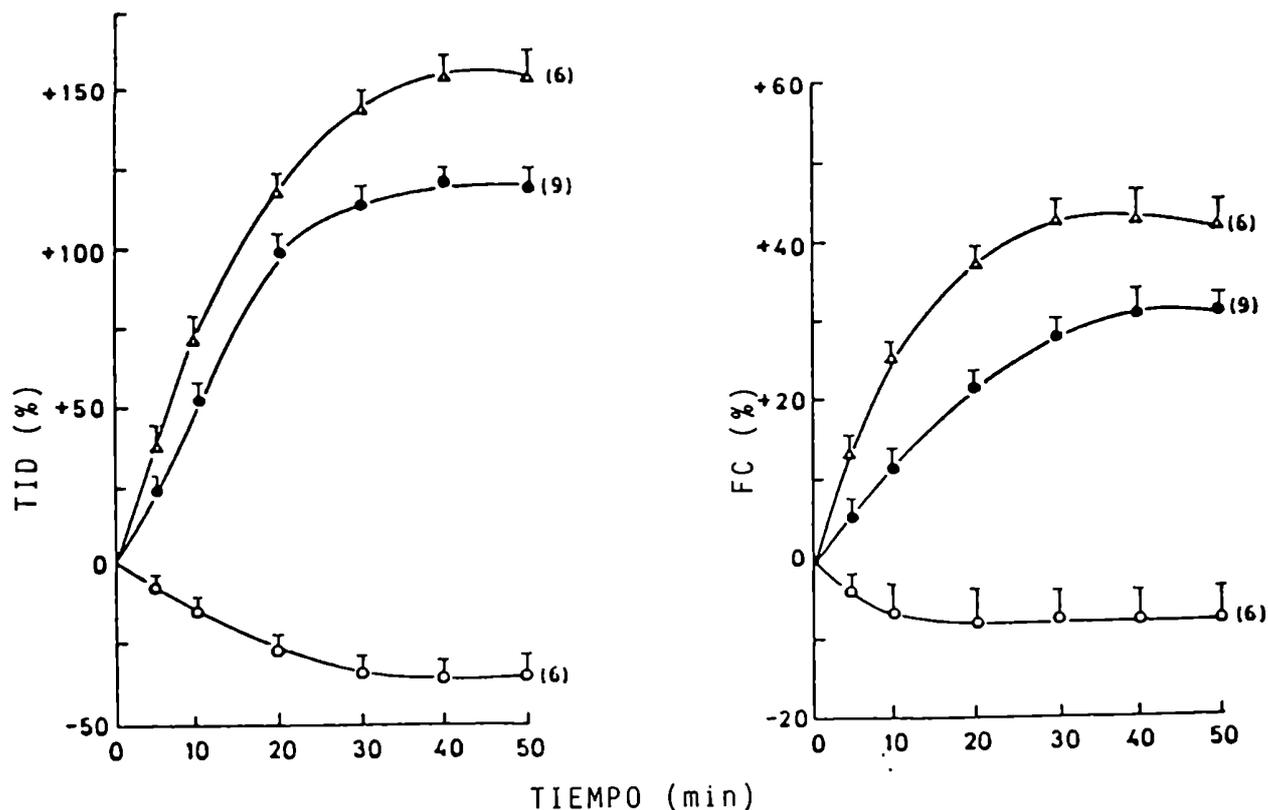
Efecto comparativo de diferentes concentraciones de linfocitos (L) de pacientes chagásicos y dadores normales sobre aurícula aislada de rata:



0.5ml de una suspensión de 8×10^6 células/ml conteniendo L totales normales (L) (□---□), L totales de pacientes chagásicos (Lch) (○---○), Tch (△---△) o no Tch (●---●) se enfrentaron con aurícula aislada de rata que latía espontáneamente suspendida en 15 ml de KRB como se detalló en Materiales y Métodos. El tiempo transcurrido entre 2 agregados sucesivos fue de 20 minutos. La FIGURA 10 representa la media aritmética \pm error standard de la media de los cambios porcentuales de la tensión isométrica desarrollada (TID, izquierda) y frecuencia (FC, derecha) de contracciones en las ordenadas, en función de la cantidad de células agregadas al baño de reacción. Se indica entre paréntesis el número de ensayos realizados con células de distintos pacientes.

FIGURA 11:

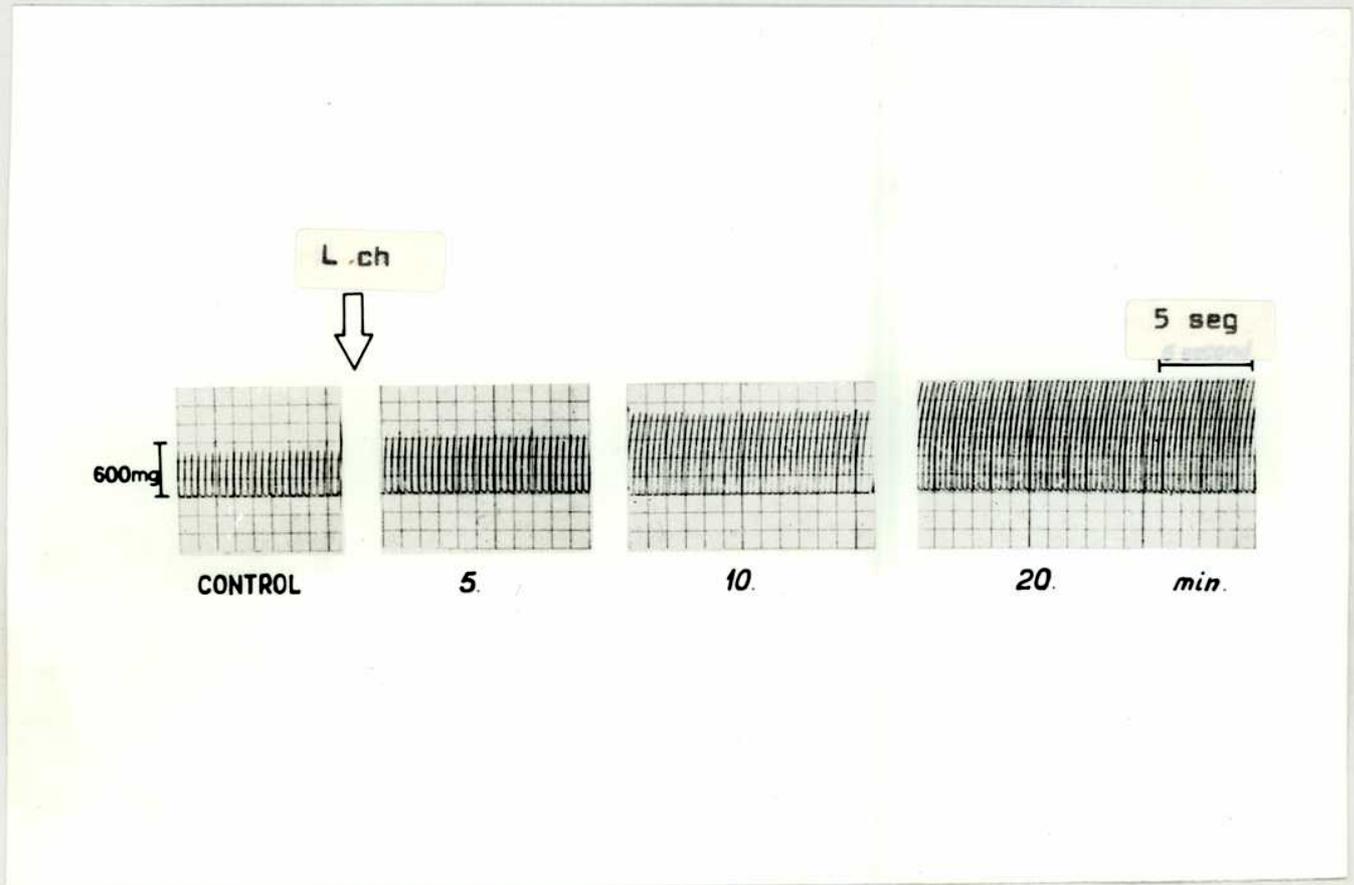
Cinética de la reacción de linfocitos de pacientes chagásicos con tejido auricular:



Las aurículas aisladas de rata se suspendieron en KRB en presencia de 4×10^5 /ml Lch (●---●), Tch (Δ---Δ) o no Tch (○---○). Se representan los valores de cambio porcentual de la TID (izquierda) y frecuencia (derecha) en función del tiempo, calculando la media aritmética \pm error standard de la media de 6 o 9 experimentos según se indica entre paréntesis.

FIGURA 12:

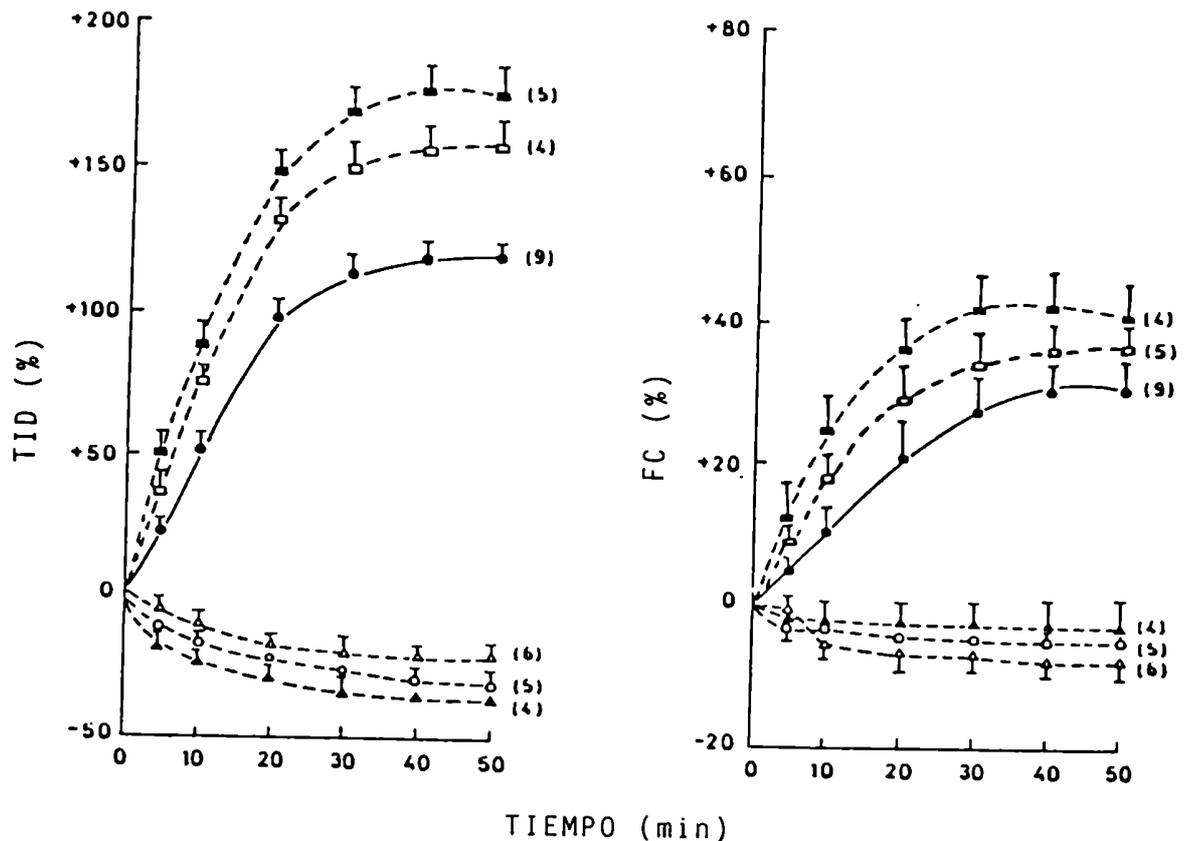
Efecto del agregado de linfocitos chagásicos sobre la contracti-
lidad cardíaca:



Se muestra un trazado representativo de la frecuencia (FC) y tensión contráctil (TID) de la aurícula aislada antes y después de 5, 10 y 20 minutos del agregado de Lch (concentración final en el baño de reacción: 4×10^5 células/ml).

FIGURA 13:

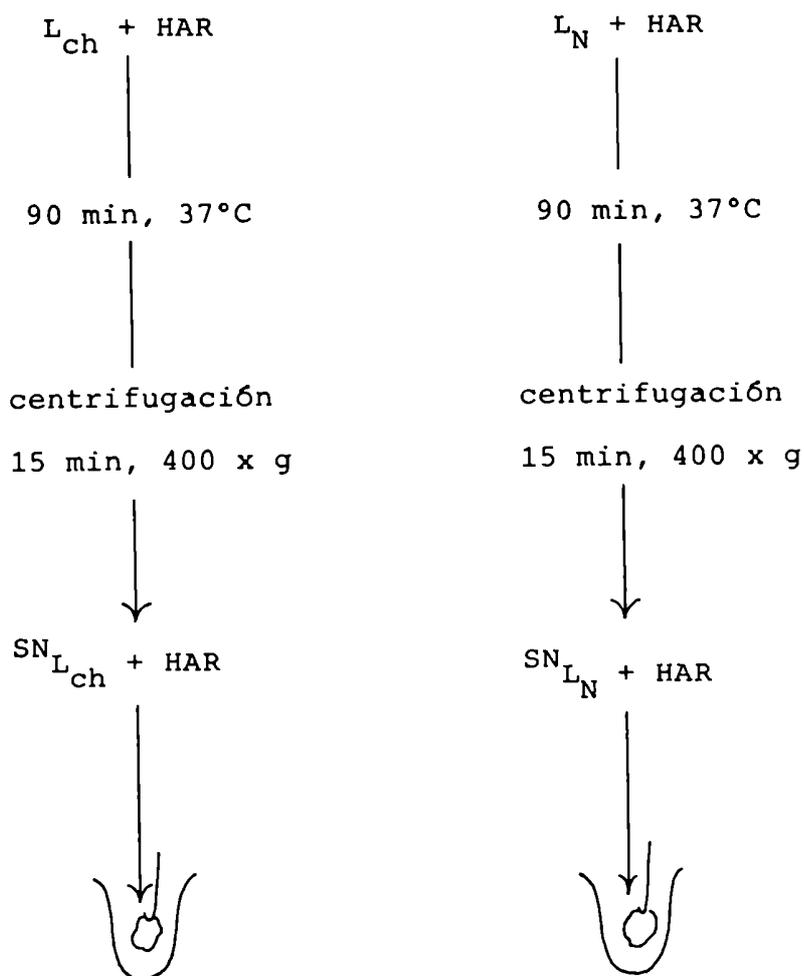
Efecto de inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico
sobre la acción estimulante de los linfocitos chagásicos:



4×10^5 Lch se enfrentaron con la preparación de aurícula aislada de rata suspendida en KRB (●---●) o en KRB conteniendo uno de los siguientes inhibidores: indometacina 10^{-6} M (■---■); FPL 55712 10^{-7} M (○---○); ASA $1,8 \times 10^{-6}$ M (□---□); NDGA 10^{-5} M (△---△) o ETYA 10^{-6} M (▲---▲). Los valores basales de TID y FC considerados como 100% se tomaron con cada uno de los inhibidores o con KRB y se representan los cambios porcentuales (media aritmética \pm error standard de la media) después del agregado de los linfocitos. Entre paréntesis figura el número de ensayos.

FIGURA 14:

Esquema de obtención de sobrenadantes libres de células por incubación de linfocitos con homogenato de aurícula de rata:



Se incubaron linfocitos normales (LN) o linfocitos chagásicos (Lch) (5×10^4) con 0,5 ml de un homogenato de aurícula de rata suspendido en medio de cultivo. Se siguió el esquema presentado para obtener sobrenadantes (SNs) libres de células.

TABLA 1:

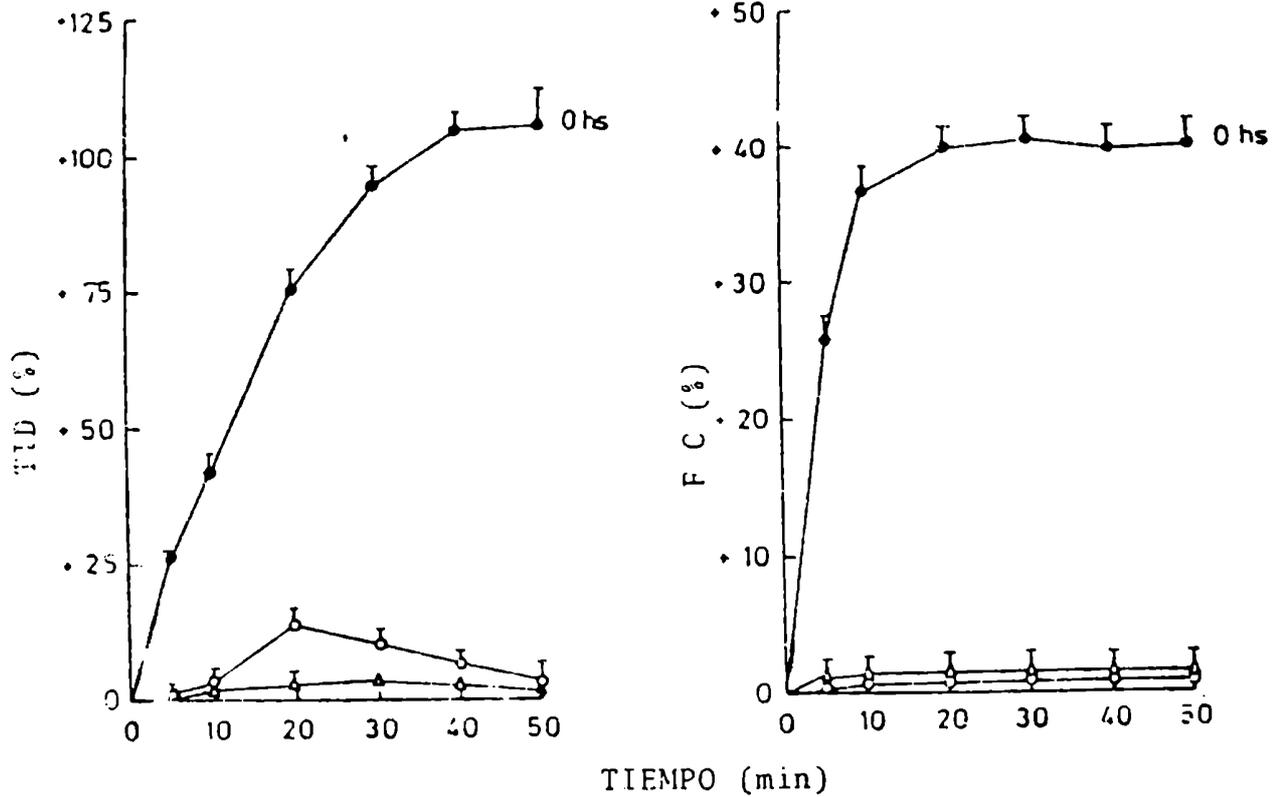
Efecto de sobrenadantes de reacción de Lch con homogenatos de aurícula de rata (HAR) sobre preparación de aurícula aislada de rata:

SNs de	n	TID (%)	FC (%)
Lch + HAR	7	+ 52,2 ± 9,1	+ 11,0 ± 2,0
LN + HAR	7	+ 4,2 ± 2,8	+ 1,2 ± 0,8

Se incubaron 5×10^6 Lch o LN con 0,5 ml de HAR a 37°C durante 90 minutos. Se centrifugaron y se separaron los sobrenadantes (SNs) libres de células. Estos SNs se agregaron a la preparación de aurícula aislada y se midieron los cambios de tensión (TID) y frecuencia (FC) de contracciones después de 40 minutos de reacción. Los SNs de HAR, Lch o LN solos no modificaban la actividad contráctil de la aurícula de rata.

FIGURA 15:

Cinética de la reacción de linfocitos humanos normales activados con PHA con aurícula aislada de rata:

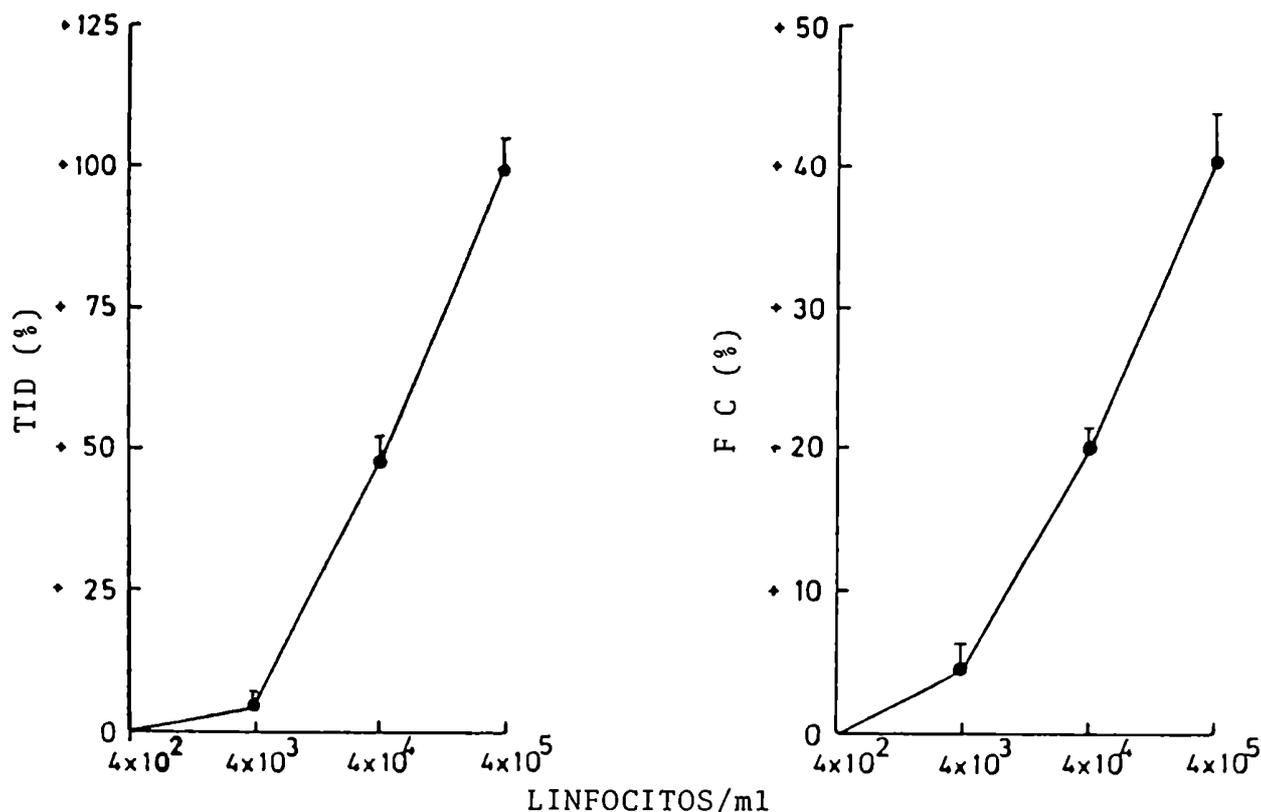


Se suspendió la aurícula aislada de rata en solución KRB con 4×10^5 /ml linfocitos normales (L) (○---○) o 10 ug/ml de PHA (△---△) o 4×10^5 /ml L agregados simultáneamente con 10 ug/ml PHA al baño de reacción (●---●).

Se representa la media aritmética \pm error standard de la media de los cambios porcentuales de los valores iniciales de tensión (TID, izquierda) y frecuencia (FC, derecha) de contracciones en función del tiempo de reacción (5 a 6 experimentos).

FIGURA 16:

Efecto de distintas concentraciones de linfocitos humanos normales (L) sobre la actividad contráctil de aurícula aislada de rata en presencia de PHA:



Se representan los cambios porcentuales de los valores iniciales de tensión (TID, izquierda) y frecuencia (FC, derecha) de contracciones de aurícula de rata que late espontáneamente en presencia de 10 ug/ml PHA después del agregado de cantidades sucesivas de L. Cada concentración se dejó actuar durante 40 minutos antes de tomar los valores. La PHA sola no produce cambios de tensión ni frecuencia. Se grafican las medias aritméticas \pm error standard de la media de 4 experimentos.

TABLA 2:

Eficiencia de la separación de células formadoras y no formadoras de rosetas E:

Población celular	% de rosetas E	n
L	54,7 ± 1,5	19
" no T "	18,8 ± 3,9	10
" T "	62,6 ± 3,4	10

Se separaron células por formación de rosetas con eritrocitos de carnero (E) en 2 fracciones: "I" formadora de rosetas y "no T" no formadora de rosetas E, tal como se explicó en Materiales y Métodos. Se comprobó la eficiencia de la separación después de la lisis con NH_4Cl por un nuevo ensayo de formación de rosetas E. Se consideran rosetas cuando un L une 3 o más E (Media aritmética ± error standard de la media; n = número de experimentos).

TABLA 3:

Caracterización de las células efectoras:

Células efectoras + PHA	TID (%)	FC (%)	n
"T"	+ 85 ± 6	+ 38 ± 4	5
"no T"	- 18 ± 2	0	6
L	+ 106 ± 4	+ 39,1 ± 2	6

Se preparó la población total (L) y las fracciones formadoras ("T") y no formadoras de rosetas E ("no T") como se explicó en Materiales y Métodos. No se observan cambios de tensión ni frecuencia en presencia de 10 ug/ml de PHA sola o de cualquiera de las fracciones celulares sola. Se determinó el cambio porcentual de tensión (TID) y frecuencia (FC) de contracciones después de 40 minutos de reacción de las aurículas con los linfocitos + PHA; n = número de experimentos.

TABLA 4:

Efecto de distintas drogas sobre la actividad contráctil espontánea de aurícula aislada de rata y sobre viabilidad linfocitaria:

Droga	TID (%)	FC (%)	n	Viab. (%)	n
Ninguna	1	1		95 ± 3	6
Propanolol	0,96 ± 0,04	0,94 ± 0,06	5	91 ± 2	4
Indometacina	1,00 ± 0,08	0,96 ± 0,06	6	89 ± 3	4
ASA	1,02 ± 0,08	0,97 ± 0,04	7	N.D.	
NDGA	1,01 ± 0,08	0,99 ± 0,07	6	89 ± 2	5
ETYA	0,96 ± 0,08	0,92 ± 0,06	6	89 ± 3	4
FPL 55712	1,00 ± 0,06	0,92 ± 0,07	7	91 ± 2	5

Se determinó la media aritmética ± error standard de la media de los cambios porcentuales de tensión y frecuencia de contracciones de la aurícula, y el porcentaje de células viables después de 1 hora de incubación con las distintas drogas respectivamente. Las concentraciones son las indicadas en Materiales y Métodos. n = número de experimentos.

TABLA 5:

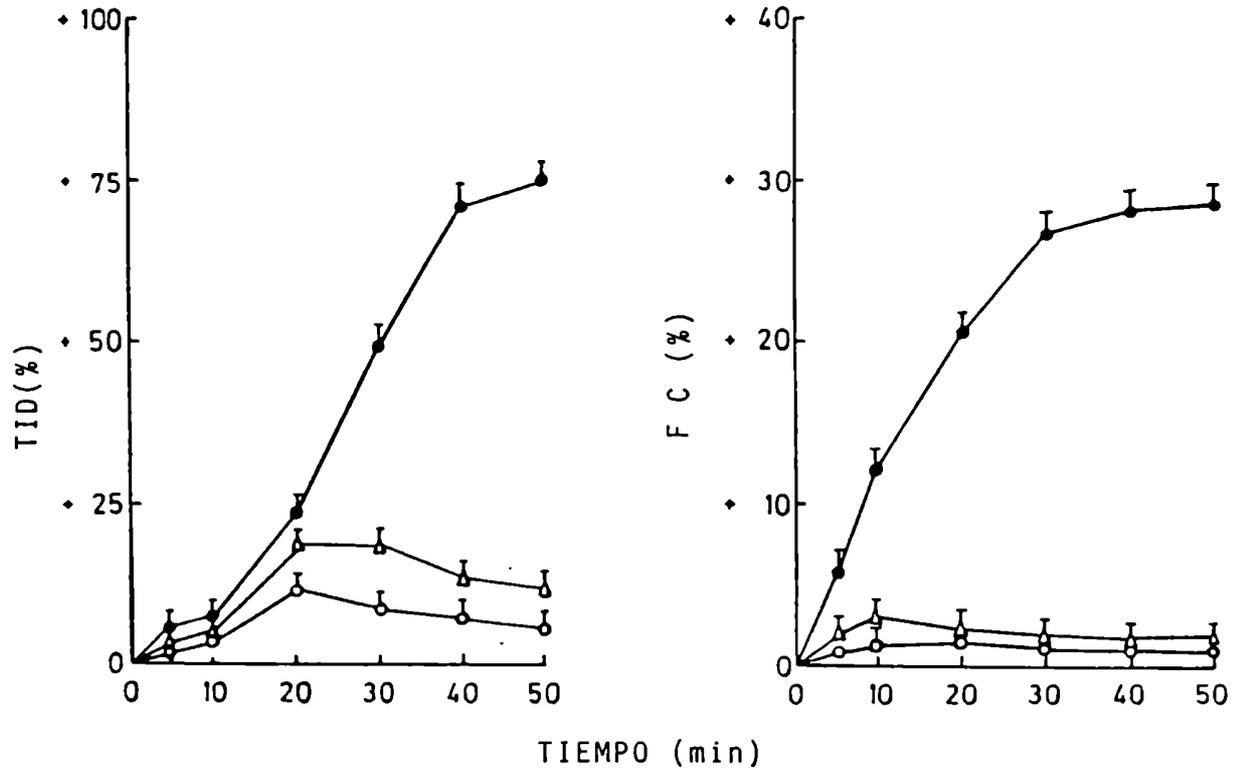
Efecto de un antagonista β adrenérgico y de inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico sobre la reacción de linfocitos humanos normales tratados con PHA con aurícula aislada de rata:

Droga	TID (%)	FC (%)
Ninguna	+ 92 \pm 3	+ 36 \pm 4
Propanolol 10 ⁻⁷ M	+ 85 \pm 5	+ 37 \pm 2
Indometacina 10 ⁻⁴ M	+162 \pm 2	+ 37 \pm 3
ASA 1,8 x 10 ⁻⁴ M	+165 \pm 1	+ 40 \pm 5
NDGA 10 ⁻⁵ M	+ 8 \pm 2	+ 3 \pm 1
ETYA 10 ⁻⁷ M	+ 2 \pm 1	+ 1 \pm 0,5
FPL 55712 10 ⁻⁷ M	+ 5 \pm 2	+ 2 \pm 0,5

Se enfrentaron linfocitos humanos normales estimulados con PHA con la preparación de aurícula aislada de rata en presencia o ausencia de una serie de drogas. Se determinaron los cambios porcentuales de tensión (TID) y frecuencia (FC) de contracciones después de 40 minutos de reacción. Se tabula la media aritmética \pm error standard de la media de 5 a 8 experimentos.

FIGURA 17:

Cinética de la reacción de linfocitos humanos normales (L) trata-
dos con A23187 y enfrentados con aurícula aislada de rata:



Se suspendió la aurícula aislada de rata en KRB conteniendo 4×10^5 L/ml (○---○), A23187 10^{-6} M (△---△) o 4×10^5 L/ml + A23187 10^{-6} M (●---●) agregados simultáneamente. Se representa la media aritmética \pm error standard de la media de los cambios porcentuales de tensión (TID, izquierda) y frecuencia (FC, derecha) de contracciones de 5 experimentos.

FIGURA 18:

Diseño experimental empleado para distinguir la actividad de las células y sus sobrenadantes:

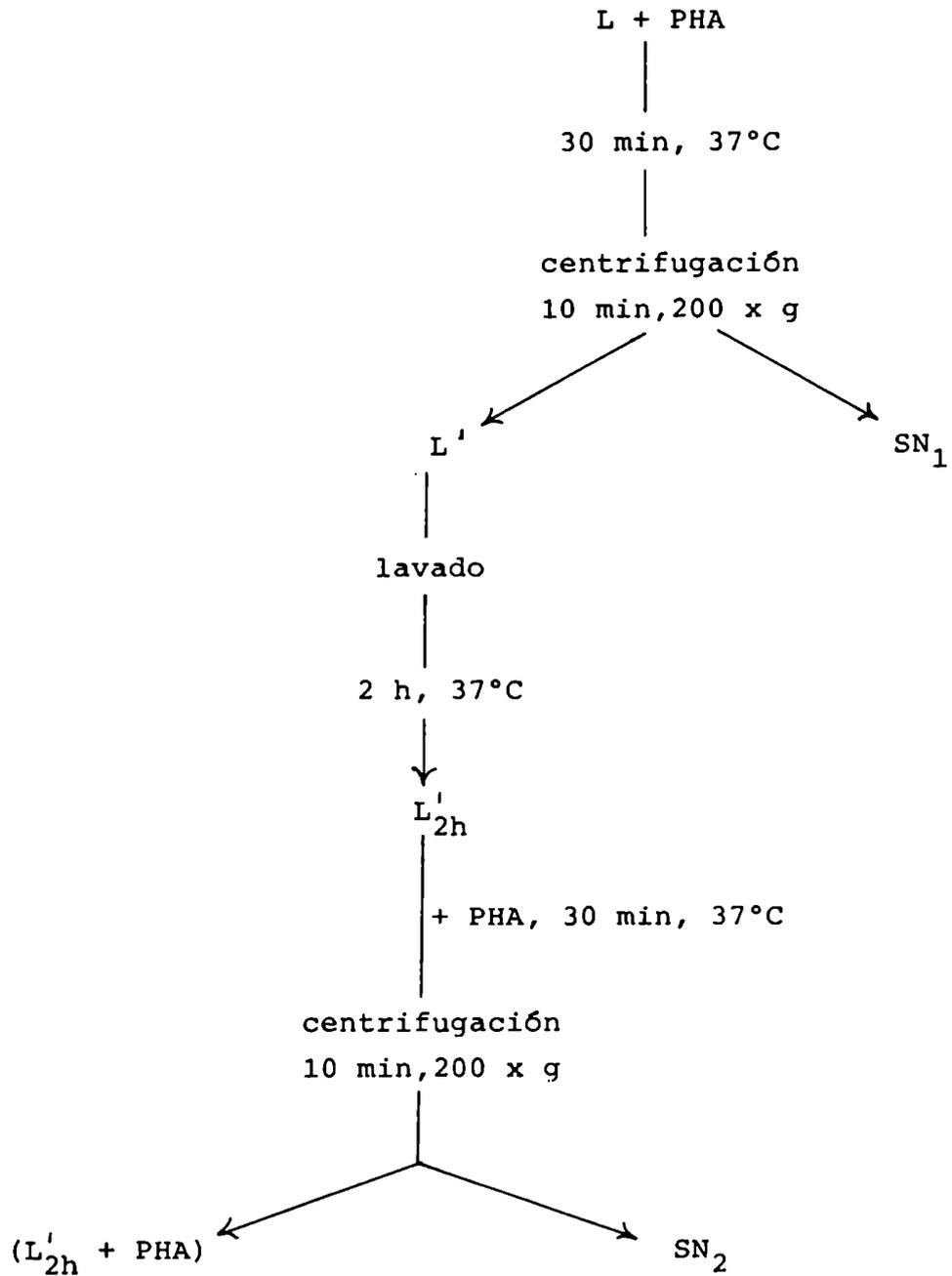
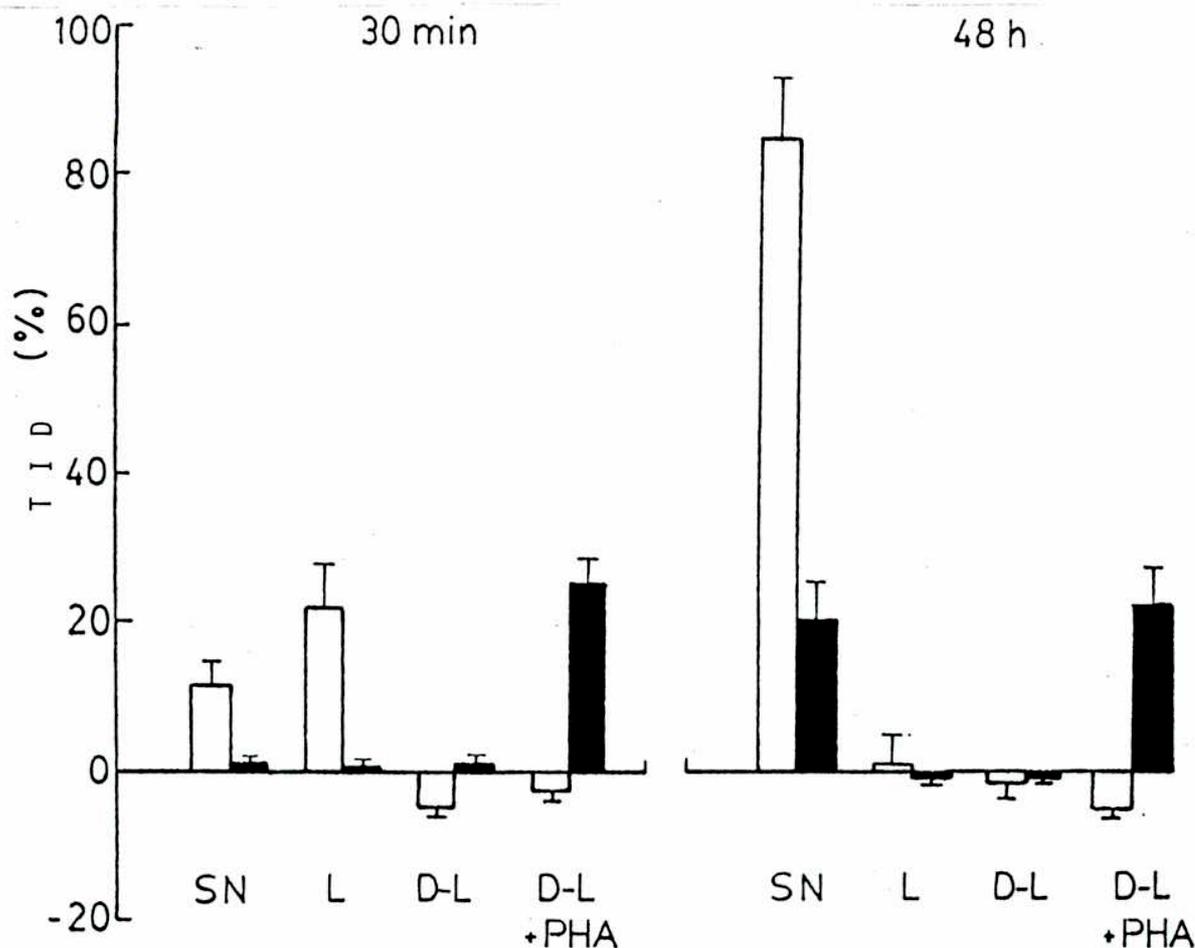


FIGURA 19:

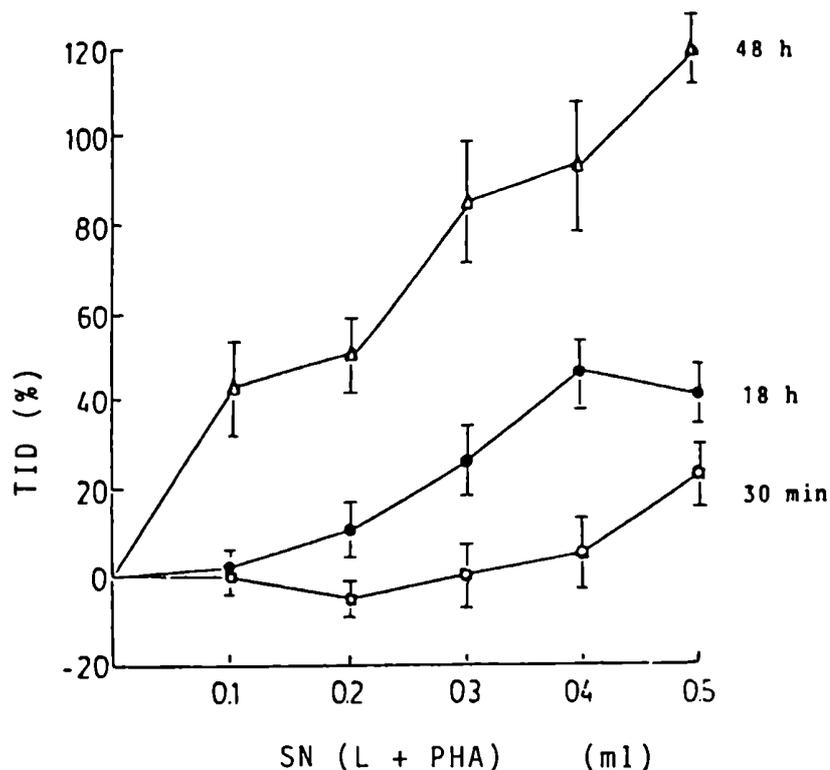
Actividad de L y sus sobrenadantes de estimulación con PHA du
rante 30 minutos o 48 horas:



8×10^6 L/ml se incubaron con RPMI-SFB (■) o RPMI-SFB conteniendo 10 ug/ml PHA (L-PHA, □) durante 30 minutos o 48 horas a 37°C. Se centrifugó y se separaron los sobrenadantes. Las células se lavaron y se resuspendieron en un volumen de RPMI igual al original. Los L lavados se enfrentaron inmediatamente después de la separación con la aurícula aislada (L) o después de 2h de incubación a 37°C (D-L). Los D-L también se emplearon después del agregado de 10 ug/ml de PHA e incubación durante 30 minutos a 37°C (D-L + PHA). Se midieron los cambios porcentuales de tensión (TID) de la aurícula después de 10 minutos del agregado de 0,5 ml de células o sobrenadantes al baño de reacción. Se representa la media aritmética \pm error standard de la media de 4 a 12 experimentos.

FIGURA 20:

Efecto de cantidades crecientes de sobrenadantes de estimulación de linfocitos normales con PHA por distintos tiempos:



Se obtuvieron sobrenadantes de estimulación de 8×10^4 L/ml con PHA (10 ug/ml) incubados durante 30 minutos (\square — \square), 18 h (\bullet — \bullet) y 48 h (Δ — Δ) respectivamente. Se agregaron a la preparación de aurícula aislada de rata en alícuotas de 0,1 ml con intervalos de 5 minutos. La dosis de 0,5 ml corresponde a un SN de 4×10^4 (L + PHA). Se determinaron los cambios porcentuales en la tensión (TID) y se restaron a estos valores los obtenidos con sobrenadantes de L no estimulados. Se representa la media aritmética \pm error standard de la media de 4 experimentos.

TABLA 6:

Efecto de la diálisis sobre la actividad de sobrenadantes de 30 minutos y 48 h de estimulación:

Tiempo estim.	n	IID (%)		
		Pre-diál.	Post-diál.	Post-diál.+ AA
30 min	7	+ 18 ± 6	+ 1 ± 2	N.D.
48 h	7	+ 67 ± 14	+ 9 ± 4	+ 25 ± 3 (n =3)

Se obtuvieron sobrenadantes por estimulación de 8×10^4 L normales/ml con PHA (10ug/ml) durante 30 minutos y 48 horas respectivamente. Se dializaron contra 500 volúmenes de KRB durante 1 h con 3 cambios de solución externa. Los SNs dializados y sin dializar fueron agregados al baño de la preparación de aurícula aislada de rata y se determinó el cambio porcentual de la tensión contráctil (IID) a los 10 minutos. En 3 experimentos se añadió araquidonato de sodio (AA, $1,98 \times 10^{-4}$ M) en el baño de reacción. Se tabula la media aritmética ± error standard de la media de n experimentos.

TABLA 7:

Comparación del efecto de la estimulación linfocitaria con PHA y WGA: actividad de los sobrenadantes sobre contractilidad auricular y blastogénesis:

Lectina	TID (%)	Captación ^3H -tim. (cpm)
PHA	36 \pm 7	31997 \pm 7602
WGA	24 \pm 9	5293 \pm 1382
Control	- 4 \pm 2	3762 \pm 1164

Se enfrentaron sobrenadantes obtenidos por incubación durante 18 h a 37 °C de L ($8 \times 10^6/\text{ml}$) con PHA, WGA o RPMI (controles) como se indicó en Materiales y Métodos con la preparación de aurícula aislada de rata. Se determinaron los cambios porcentuales respecto del nivel inicial de TID. Se valoró la blastogénesis por incorporación de timidina tritiada (^3H -tim) después de 72 h de cultivo con la lectina y se comparó con los controles. Se tabula la media aritmética \pm error standard de la media de 4 experimentos.

TABLA 8:

Dependencia del efecto de estimulación contráctil y la proliferación linfocitaria inducida por PHA de la presencia de Ca^{2+} :

Droga	n	TID (%)	
		SN (L + PHA)	SN L
Control	8	+ 47 ± 8	- 1 ± 9
Verapamil $10^{-5}M$	3	+ 8 ± 1	1 ± 1
EGTA $10^{-2}M$	3	- 2 ± 3	- 3 ± 3

	n	Incorporación de 3H -tim (cpm)	
		L + PHA	L
Control	7	59366 ± 10838	3504 ± 1613
Verapamil $10^{-5}M$	5	50302 ± 4609	3527 ± 1735
EGTA $10^{-2}M$	4	561 ± 88	444 ± 89

Para el efecto sobre el tejido auricular se incubaron $8 \times 10^4 L/ml$ durante 18 h en presencia (SN (L + PHA)) o ausencia (SN L) de PHA en RPMI o RPMI conteniendo los inhibidores. Se separaron los sobrenadantes y se agregó 0,5 ml al baño en que laten las aurículas (15 ml de KRB). Se determinaron los cambios porcentuales de la TID después de 10 minutos de reacción. Se tabula la media aritmética ± error standard de la media de n experimentos. La captación de timidina de L + PHA y L se determinó a las 72 h de cultivo en presencia o ausencia de inhibidores. La viabilidad celular era de 85-95% por el ensayo de exclusión de azul trypan. Se expresa la media aritmética ± error standard de la media de n experimentos en cuentas por minuto (cpm).

TABLA 9:

Acción de glucocorticoides sobre la generación del efecto de estimulación auricular y proliferación linfocitaria:

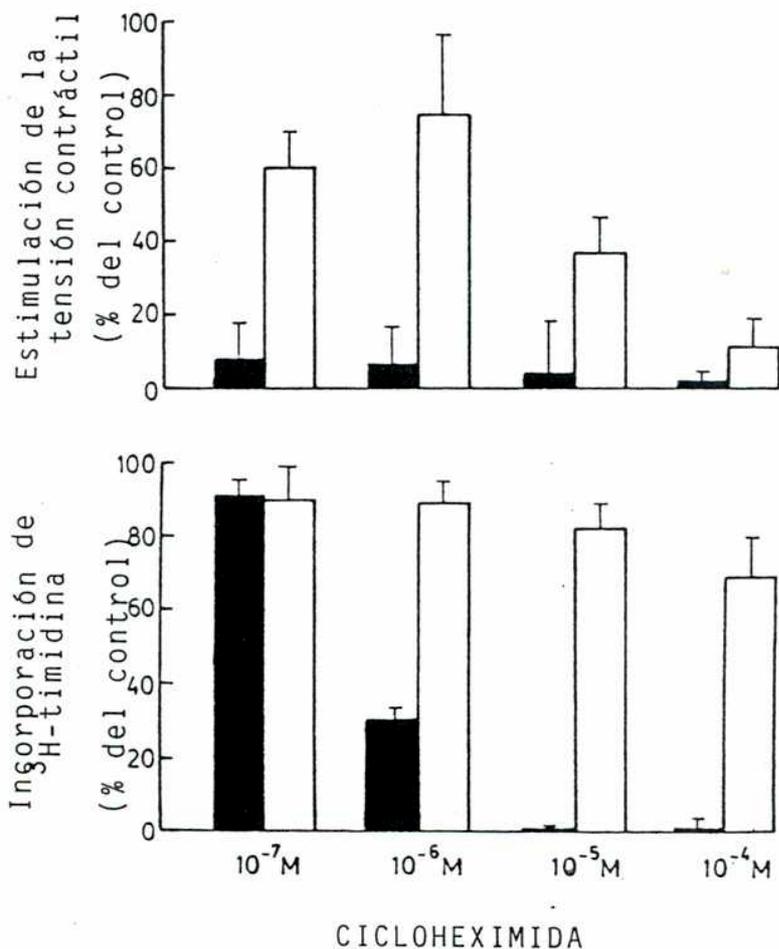
Droga	n	TID (%)	
		SN (L + PHA)	SN L
Ninguna	8	+ 47 ± 8	- 1 ± 9
Corticosterona	3	+ 4 ± 3	+ 1 ± 2
Dexametasona 10 ⁻⁹ M	5	- 4 ± 6	- 1 ± 1
Dexametasona 10 ⁻⁸ M	3	+ 6 ± 13	+ 5 ± 5

Droga	n	Incorporación de ³ H-tim (cpm)	
		L + PHA	L
Ninguna	9	36591 ± 4305	1380 ± 532
Corticosterona	3	296 ± 139	192 ± 62
Dexametasona 10 ⁻⁹ M	4	51363 ± 5812	1490 ± 176
Dexametasona 10 ⁻⁸ M	4	67243 ± 17305	832 ± 23

Se emplearon corticosterona 10⁻⁹M y dexametasona en las 2 concentraciones indicadas. Los ensayos se realizaron tal como se describió en la TABLA 8 para inhibidores relacionados con la concentración de Ca²⁺.

FIGURA 21:

Efecto de la cicloheximida sobre la generación de la estimulación contráctil y la proliferación linfocitaria. Reversibilidad:



Se incubaron 8×10^6 L/ml a 37°C durante 18 h con RPMI o RPMI + cicloheximida en distintas concentraciones. Una alícuota de las células se lavó y resuspendió en RPMI + PHA (■) y a las células restantes se les añadió PHA (□). Se separaron los sobrenadantes después de 18 h de cultivo y se determinó el efecto sobre la preparación de aurícula aislada como se detalló en Materiales y Métodos. Se comparó con el de sobrenadantes control obtenidos con PHA en ausencia de inhibidores. La proliferación inducida por PHA de L tratados con cicloheximida y lavados o no lavados se determinó por la incorporación de timidina tritiada (^3H -tim) a las 72 h de cultivo. Se representa el porcentaje del valor control en ambos casos. (Media aritmética \pm error standard de la media en cada caso de 3 a 5 experimentos).

TABLA 10:

Efecto de la incubación de los sobrenadantes de estimulación
linfocitaria con anti-IL-2:

	n	TID (%)	
		RPMI	anti-IL-2
SN (L +PHA)	8	+ 34 ± 5	+ 14 ± 3
SN L	5	- 2 ± 3	+ 7 ± 4

Se obtuvieron sobrenadantes (SNs) de 8×10^6 L/ml incubados durante 18h a 37 °C en RPMI (SN L) o RPMI con 10ug/ml de PHA (SN (L + PHA)). Alicuotas de 0,4 ml de SN se incubaron con 100 ul del anticuerpo monoclonal anti-IL-2 o con RPMI durante 1 h previo al ensayo. Luego se añadieron a la preparación de aurícula aislada de rata suspendida en 15 ml de KRB. Se determinaron los cambios porcentuales en la TID luego de 10 minutos de contacto. El AcM anti-IL-2 solo no tenía efecto sobre la TID ($+1 \pm 1$, n=4). Se expresa la media aritmética ± error standard de la media de n experimentos.

TABLA 11:

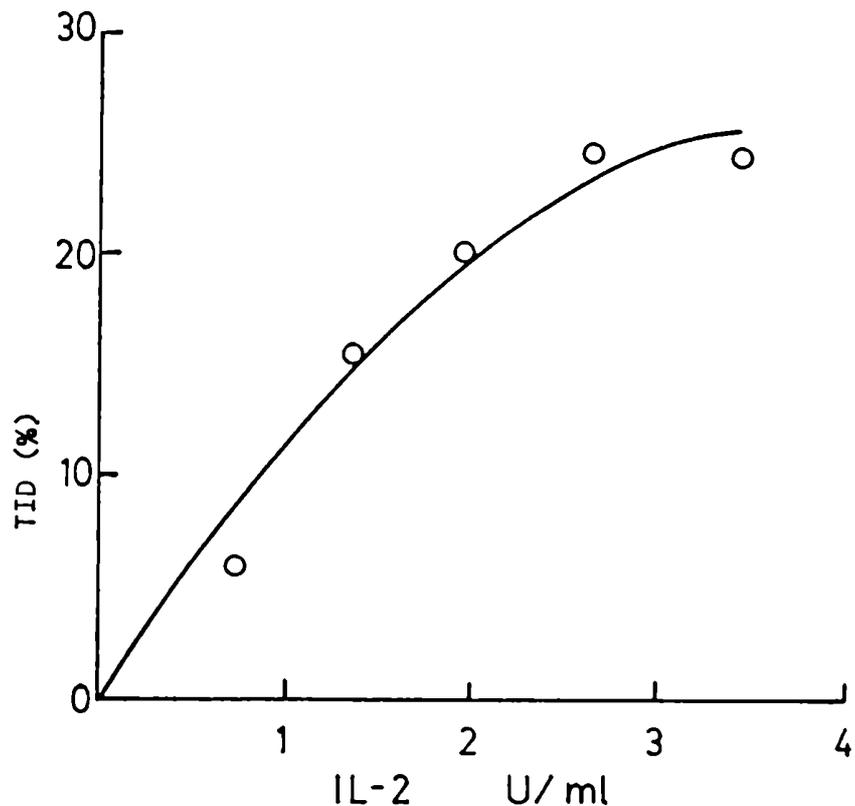
Efecto de la IL-2 y araquidonato de sodio sobre la contractilidad auricular:

AA x 10 ⁻⁴ M	TID (%)				
	no IL-2 (n=8)	IL-2n (n=8)	IL-2n + anti-IL-2 (n=3)	IL-2r (n=6)	IL-2r + anti-IL-2 (n=4)
0	0	+ 1 ± 1	-2 ± 2	- 4 ± 2	-1 ± 1
0.66	-2 ± 1	+ 1 ± 1	+2 ± 2	- 2 ± 2	-4 ± 3
1.32	-1 ± 2	+10 ± 3	-1 ± 3	+18 ± 5	-1 ± 1
1.98	+1 ± 2	+30 ± 4	+8 ± 11	+23 ± 8	0 ± 4

Se añadieron 25 ul de IL-2 natural (IL-2n) o recombinante (IL-2r) conteniendo 100U/ml a la preparación de aurícula aislada de rata suspendida en 15 ml KRB. Para la inhibición se preincubaron 100 ul de una solución de 50ug/ml de un anticuerpo monoclonal anti-IL-2 con la IL-2 durante 1 h previo al ensayo. Esta concentración de IL-2 no modifica la TID. Se determinaron los cambios porcentuales en la TID 5 minutos después del agregado de los reactivos como se describió en Materiales y Métodos. Se construyeron curvas acumulativas dosis-respuesta agregando cantidades crecientes de araquidonato de sodio (AA) a aurículas suspendidas en KRB, KRB + IL-2 o KRB + IL-2 + anti-IL-2. El tiempo entre dos agregados sucesivos de AA fue de 3 a 5 minutos. Se tabula la media aritmética ± error standard de la media de n experimentos. A las concentraciones empleadas el AA no tiene efecto propio sobre la preparación auricular.

FIGURA 22:

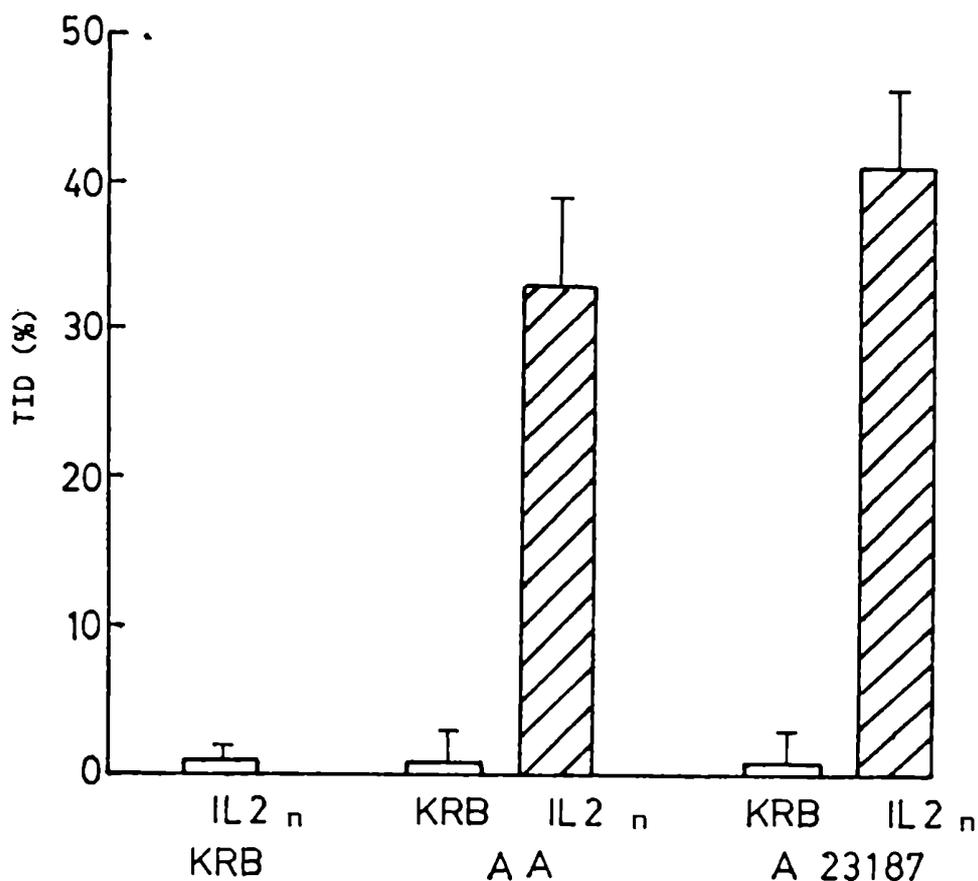
Curva dosis-respuesta de IL-2n sobre aurícula aislada de rata en presencia de araquidonato de sodio:



Se añadió araquidonato de sodio (AA) a la aurícula de rata suspendida en 15 ml de KRB de modo que la concentración final fuera de $1,98 \times 10^{-4}M$. Esta concentración no tuvo efecto propio sobre la aurícula durante el período de observación. Se agregaron cantidades crecientes de IL-2n a intervalos de 3 minutos. En este rango de concentraciones la IL-2n no afectó la TID. Se determinaron los cambios porcentuales de la tensión tomando el valor inicial en ausencia de AA o IL-2.

FIGURA 23:

Efecto de la IL-2 en presencia de araquidonato de sodio o A23187 sobre la contractilidad cardíaca:



Se determinaron los cambios porcentuales en la tensión contráctil (TID) de aurícula de rata latiendo espontáneamente en 15 ml de KRB, KRB + AA ($1,98 \times 10^{-4}M$) o KRB + A23187 ($2 \times 10^{-4}M$) antes (□) y después (▨) del agregado de IL-2n (2 U/ml), después de 10 minutos de reacción. Se representa la media \pm error estándar de la media de 7 a 9 experimentos.

TABLA 12:

Efecto de un inhibidor del ciclo del fosfatidil inositol sobre la actividad de IL-2 en presencia de AA o A23187:

	TID (%)	
	KRB	NCDC
AA	32 ± 7 (n=7)	-2 ± 6 (n=4)
A23187	41 ± 5 (n=9)	4 ± 2 (n=7)

Se preincubaron las aurículas con $5 \times 10^{-6}M$ NCDC durante los 15 minutos previos al agregado de AA ($1,98 \times 10^{-6}M$) o A23187 ($2 \times 10^{-6}M$). Luego se añadió IL-2n (2 U/ml) y se determinaron los cambios porcentuales de tensión contráctil (TID) después de 10-15 minutos de reacción, como se indicó en Materiales y Métodos. Se tabula la media aritmética ± error standard de la media de n experimentos.

NCDC, AA y A23187 no afectaron la TID en las condiciones utilizadas. La preincubación de IL-2 con NCDC no modificó su actividad.

TABLA 13:

Efecto de un diacilglicérido sintético (DAG) en presencia de
araquidonato de sodio o ionóforo de calcio:

	TID (%)	
	KRB	NCDC
AA	37 ± 9 (n=5)	44 ± 8 (n=3)
A23187	37 ± 6 (n=7)	31 ± 4 (n=5)

Se incubaron las aurículas en KRB o KRB + NCDC ($5 \times 10^{-6}M$) durante los 15 minutos previos al añadido de AA ($1,98 \times 10^{-6}M$) o A23187 ($2 \times 10^{-6}M$). Luego, se agregó DAG ($1,25 \times 10^{-9}M$) y se determinaron los cambios porcentuales en la TID como en el caso anterior. El DAG en esa concentración no afecta la contractilidad de la aurícula.

DISCUSION

Los resultados expuestos en esta tesis se discutirán en dos grupos, tal como fueron presentados, terminando la discusión con una conclusión general.

Trabajos previos de otros autores (185, 186) demostraron que los linfocitos de los enfermos chagásicos pueden reconocer antígenos en tejido cardíaco homólogo y heterólogo. Por este motivo consideramos que estas células mononucleares se activan al enfrentar antígenos presentes en la aurícula. En el modelo de sensibilización linfocitaria in vivo, los resultados presentados demuestran que los linfocitos periféricos de los pacientes chagásicos crónicos reaccionan con tejido auricular que late espontáneamente, produciendo un incremento de la tensión y frecuencia de contracciones.

La población celular responsable del efecto inotrópico y cronotrópico positivo estaba presente en la fracción formadora de rosetas con eritrocitos de carnero, por lo que se trataría de linfocitos T (FIGURA 10). Este resultado fue confirmado posteriormente por otros estudios del laboratorio en los cuales se identificó a la población efectora como aquella que expresa el antígeno CD4 (203). No resulta muy claro comprender cómo linfocitos de esta estirpe, que normalmente reconocen antígenos y responden en el contexto de antígenos de histocompatibilidad de clase II propios (24) pueden reconocer estructuras heterólogas y

además montar una respuesta en un tiempo tan breve. Una posibilidad alternativa sería que los linfocitos de estos pacientes se encuentren en un estado distinto del de reposo y que la exposición a antígenos del tejido cardíaco suministre una señal adicional generando entonces el efecto.

La población no formadora de rosetas disminuía la tensión contráctil sin modificar la frecuencia de las contracciones. Es difícil atribuir el efecto a una subpoblación celular dada ya que en realidad la fracción que no forma rosetas E contiene varias clases de células como linfocitos B, K, monocitos. Estos experimentos indican que la actividad observada con la población total es el resultado de la contribución de ambas fracciones, con predominio del efecto positivo.

En los pacientes chagásicos crónicos, se ha descrito la presencia de anticuerpos contra el receptor β adrenérgico (196, 198) con efecto estimulante de la contractilidad auricular. Esta actividad puede ser amplificada por sistemas efectores humorales como el complemento (195) o por sistemas efectores celulares como linfocitos humanos normales con receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G (197). En ambos casos los antagonistas β adrenérgicos anulan la inducción del efecto inotrópico positivo. En el caso del efecto directo de los linfocitos de pacientes chagásicos observado en este trabajo el mecanismo es diferente ya que no pudo ser abolido con el antagonista β adrenérgico (-)-propranolol. En cambio, el efecto estimulante se bloqueó con el antagonista de la SRS-A, FPL 55712 (103) y

también fue anulado por inhibidores de la vía de la lipoxigenasa NDGA $10^{-5}M$ y ETYA $10^{-6}M$, lo que involucra a la SKS-A en este efecto. La SRS-A está formada por leucotrienos (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4) derivados del ácido araquidónico, de modo que estos compuestos serían los causantes de los cambios de tensión y frecuencia de contracciones. Precisamente Terashita y col. (204) observaron que los leucotrienos son capaces de actuar sobre corazón aislado de cobayo produciendo un efecto inotrópico positivo. Otros autores (205), empleando el órgano entero y estudiando el efecto de distintos leucotrienos por perfusión, encontraron efectos depresores de la contractilidad producidos por LTs. La depresión era consecuencia de la disminución del flujo coronario, ya que el efecto predominante de LTs en este sistema fue la vasoconstricción.

En cambio, cuando empleamos inhibidores de la vía de la ciclooxigenasa, indometacina $10^{-6}M$ y ácido acetilsalicílico $1,8 \times 10^{-4}M$, se observó una exacerbación del efecto positivo. Esto último probablemente se debe a una mayor disponibilidad de AA que podía ser metabolizado por lipoxigenasas.

Los experimentos llevados a cabo con sobrenadantes libres de células demostraron que no era necesaria la presencia de los linfocitos efectores durante el bioensayo. Los sobrenadantes obtenidos por incubación de linfocitos de pacientes chagásicos con tejido cardíaco contenían factores solubles capaces de desencadenar el efecto estimulante de la contractilidad en la preparación de aurícula aislada de rata. Es decir, que no se requería

un contacto directo entre las células efectoras y el tejido cardíaco durante el bioensayo, aunque de estos experimentos no se puede deducir si los factores activos provienen de los linfocitos o de la aurícula. Estudios posteriores del laboratorio (203) determinaron que los linfocitos de los pacientes chagásicos, al enfrentarse con el tejido cardíaco, inducen en éste la producción de los factores que median el efecto final. Por otro lado, la actividad de los linfocitos de los pacientes no se relaciona con la presencia o ausencia de miocardiopatía. Parece estar solamente asociada a la sensibilización por el parásito (203).

En base a todas las limitaciones que presenta el modelo de sensibilización in vivo se puso mayor énfasis en el estudio de la activación linfocitaria in vitro, que puede ser controlada con relativa facilidad. Con este último modelo se intentó verificar si la generación del efecto estimulante de la contractilidad cardíaca se debía a una característica propia de los linfocitos de enfermos chagásicos o a un fenómeno más general de activación linfocitaria. Para ello se recurrió al estímulo policlonal con una lectina mitogénica: la fitohemaglutinina (PHA), y se estudió el efecto de linfocitos periféricos humanos normales tratados con este mitógeno y enfrentados con la preparación de aurícula aislada de rata.

Los resultados obtenidos demuestran que los linfocitos humanos normales estimulados con PHA o con el ionóforo de calcio A23187 reaccionan con el tejido auricular. Producen un incre-

mento de la tensión y la frecuencia de contracciones que aumenta con la concentración de células (FIGURA 17).

La población celular responsable del efecto positivo se encontraba presente en la fracción de linfocitos que forman rosetas E. Por el contrario, la fracción no formadora de rosetas tiene el efecto opuesto, disminuyendo la tensión sin modificar la frecuencia de contracciones. Como en el caso de los linfocitos de pacientes chagásicos, no se puede determinar qué clase de células dentro del compartimiento no T sería la que provoca el efecto inotrópico negativo dada la heterogeneidad de la fracción que no forma rosetas con eritrocitos de carnero. El efecto estimulante de la preparación total de linfocitos surge del balance de la contribución de ambas fracciones.

Se verificó que en este caso, como en el de los Lch, el mecanismo tampoco era β adrenérgico ya que no era afectado por el antagonista (-)-propranolol. El efecto estimulante pudo ser inhibido con NDGA y ETYA en una concentración tal que se sabe que bloquea la vía de la lipoxigenasa y no la de la ciclooxigenasa (206) sugiriendo que un metabolito de esta vía oxidativa del ácido araquidónico era responsable del efecto. Esto fue confirmado ya que el FPL 55712 bloqueó también la generación del efecto inotrópico y cronotrópico positivo. Este resultado involucra en esta actividad a la SRS-A (LTC_4 , LTD_4 y LTE_4) (101).

El empleo de inhibidores de la ciclooxigenasa, indometacina y ácido acetilsalicílico, produjo un incremento aún mayor de la tensión sin modificar la frecuencia. Esto puede ser explicado si

una fracción de AA fuera metabolizada a través de la ciclooxigenasa produciendo un efecto negativo, entonces al inhibir la actividad de esta enzima, por un lado desaparecería un componente negativo y por otro habría más ácido araquidónico disponible para ser utilizado como sustrato por lipoxigenasas. En efecto, se ha demostrado que las prostaglandinas de la serie E tienen efecto inotrópico negativo sin alterar la frecuencia de contracciones en aurícula aislada de rata (207) y que la inhibición de la ciclooxigenasa permite una mayor producción de metabolitos de efecto positivo (208). El ionóforo de Ca^{2+} aumenta la concentración intracelular de este catión y puede reproducir varios de los efectos de las lectinas mitogénicas (55) empleado en un rango limitado de concentraciones. En nuestro modelo el tratamiento con el ionóforo de Ca^{2+} indujo un efecto inotrópico y cronotrópico positivo semejante al obtenido con linfocitos estimulados por PHA. En otro sistema Yamamoto y col (209) observaron que se requería el contacto celular para que linfocitos T estimulados aumentaran la síntesis de prostaglandinas por monocitos. Para definir si en nuestro sistema era necesario el contacto de las células con el tejido cardíaco para producir el efecto, ensayamos por separado las células y sus sobrenadantes de cultivo. En el caso de linfocitos estimulados durante 30 minutos, encontramos capacidad estimulante tanto en las células como en su sobrenadante. Sin embargo, si los linfocitos eran lavados e incubados en ausencia de lectina perdían su efecto y no eran capaces de responder a un nuevo estímulo mitogénico. Esto puede deberse a que

las células se encuentran en otro punto del ciclo celular y por lo tanto reciben las señales de modo diferente. La falta de respuesta no se debe a las condiciones de incubación de las células ya que linfocitos no expuestos previamente a la PHA pero tratados de la misma manera responden a la estimulación de 30 minutos con la lectina produciendo sobrenadantes activos.

Estos resultados sugieren que ya desde los primeros momentos de la activación linfocitaria se liberan factores solubles capaces de estimular la contractilidad cardíaca. Sin embargo, el tiempo de contacto de los linfocitos con la lectina no era suficiente para inducir en las células un estado de activación perdurable. Sin embargo, no se requiere la presencia continua de la lectina durante la generación del sobrenadante. En algunos experimentos se preincubaron las células con PHA y, luego de lavadas, se utilizaron para obtener sobrenadantes que también resultaron activos en el bioensayo.

Se observó que en el caso de linfocitos estimulados durante 48 horas con la lectina, toda la actividad se encontraba en el sobrenadante. Las células habían agotado su capacidad de generar estimulación del tejido auricular y no respondían a un nuevo enfrentamiento con la PHA.

Cuando comparamos sobrenadantes obtenidos con distintos tiempos de incubación con la PHA observamos que el efecto inotrópico positivo (FIGURA 19) es mayor para períodos más prolongados de estimulación como si se acumularan uno o más productos activos en la fase soluble. Además el efecto fue mayor para cantidades

mayores del sobrenadante y la liberación ocurrió en forma gradual.

Para caracterizar de algún modo estos factores solubles se realizó en primer lugar una diálisis de breve duración (1h). La diálisis de los sobrenadantes obtenidos tanto con tiempos breves como prolongados de estimulación con la lectina fue suficiente para eliminar la actividad estimulante.

Entre las moléculas de bajo peso molecular (corte de la membrana de diálisis alrededor de 12.000 daltons) podría encontrarse el ácido araquidónico o alguno de sus metabolitos de oxidación. Por este motivo en algunos experimentos intentamos reconstituir la actividad funcional de sobrenadantes dializados añadiendo este ácido graso. Se obtuvo así una recuperación parcial del efecto. El hecho de que la recuperación funcional fuera sólo parcial puede atribuirse a que el agregado exógeno del AA no es exactamente equivalente a la generación endógena de este ácido graso libre. Técnicamente, fue imposible incluir dosis mayores en el bioensayo pues ejercen un efecto per se sobre la aurícula. Por otra parte, en otros sistemas ha sido descrita una inhibición por exceso de AA (210).

Como la liberación de factores solubles activos al sobrenadante se produce de tal modo que la actividad es máxima en momentos en que ya hay división celular (48h) quisimos analizar si el efecto estimulante de la contractilidad auricular estaba relacionado con la proliferación linfocitaria.

La estimulación con PHA lleva a los linfocitos a cumplir con

todas las etapas de la activación desde las más tempranas hasta la división celular (33). Por este motivo el empleo de esta lectina no permite distinguir la contribución de las distintas etapas de activación. Utilizamos entonces una lectina no mitogénica, la WGA, que sólo induce en los linfocitos algunos de los cambios iniciales como el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular (53), la hidrólisis del fosfatidil inositol (211) y la producción de IL-2 (46) sin llevarlos a la fase mitótica (53). Los sobrenadantes de linfocitos tratados con WGA también resultaron activos en la generación de un efecto inotrópico positivo mientras que se verificó la diferencia en la capacidad de ambas lectinas de inducir proliferación celular (TABLA 7). Larsson (46) y Reed y col. (53) demostraron que la WGA induce la expresión de receptores para IL-2 en una muy pequeña proporción de células, tanto en subpoblaciones CD4+ como CD8+, lo que justifica su pobre capacidad de inducir proliferación. En cambio, la PHA y otras lectinas mitogénicas inducen la expresión de receptores para IL-2 en la mayoría de las células respondedoras. Esto ocurre en sistemas in vitro, alcanzando un máximo a las 72 horas de estimulación (77).

La movilización de Ca^{2+} y la activación de la fosfolipasa A_2 que ocurren en las etapas tempranas de la activación (213, 214) serían otros sucesos probablemente involucrados en la generación del efecto de estimulación contráctil. Los resultados obtenidos con un bloqueante de canales de calcio dependientes de voltaje: el verapamil, demuestran que la producción de la actividad esti-

mulante requiere de manera indispensable la entrada de Ca^{2+} . En cambio, la proliferación linfocitaria puede ocurrir en presencia de este inhibidor (TABLA 8). Sin embargo, la ausencia total de Ca^{2+} ya sea por no estar presente en el medio de reacción (dato no incluido) o por hallarse quelado con EGTA (TABLA 8) impide ambos efectos. Esto significa que para la proliferación probablemente basta la redistribución del Ca^{2+} intracelular, mientras que el efecto estimulante de la contractilidad parece ser más sensible a cambios en la concentración de Ca^{2+} .

Los glucocorticoides inhiben la actividad catalítica de la fosfolipasa A_2 sobre fosfolípidos de membrana que origina ácido araquidónico libre (215). Además, pueden afectar la activación linfocitaria en distintas etapas interfiriendo con la producción de linfoquinas y monoquinas (216, 217, 218). En nuestra experiencia, la corticosterona inhibió tanto la generación del efecto estimulante de la contractilidad como la proliferación celular. Por su parte la dexametasona en las concentraciones ensayadas (10^{-6} y 10^{-9}M) no modificó la captación de ^3H -timidina pero impidió la inducción de factores solubles linfocitarios activos sobre el tejido auricular.

Cuando se empleó cicloheximida, nuevamente se demostró una discrepancia entre la capacidad de la droga para inhibir la proliferación celular y su acción sobre la generación de factores solubles estimulantes de la contractilidad cardíaca. Se observó que impedía la generación del efecto estimulante aún cuando se la utilizaba a concentraciones tan bajas que no modificaban la

proliferación linfocitaria. En concentraciones mayores, la cicloheximida impedía ambos efectos (FIGURA 21). La inhibición por cicloheximida resultó ser reversible en el caso de la respuesta proliferativa mientras que la producción de la actividad de estimulación contráctil fue irreversible. Se considera que la cicloheximida es un inhibidor que, luego de tiempos breves de reacción (5 a 20 minutos) interrumpe la síntesis proteica al actuar fundamentalmente impidiendo la iniciación de la cadena peptídica (219). Su acción es reversible aún cuando sea utilizada en concentraciones mayores que $10^{-6}M$ (10^{-5} – $10^{-4}M$) (219,–220). Por otra parte, el hecho de que la cicloheximida actúe sobre la generación de la actividad estimulante de la contractilidad auricular a concentraciones menores que las habitualmente empleadas para inhibir la síntesis proteica (219, 221) podría significar que actúa por otro tipo de mecanismo. Por ejemplo, se ha descrito (222) actividad adrenérgica de la cicloheximida en una concentración de $10^{-4}M$ en hepatocitos de rata, aunque no se conocen efectos adrenérgicos de la cicloheximida sobre células linfoides.

Considerando en conjunto este último grupo de resultados, podemos decir que la liberación de factores solubles con actividad sobre tejido cardíaco es un acontecimiento asociado a las etapas tempranas de la activación linfocitaria, es decir que no requiere división celular. Además presenta un requerimiento absoluto de iones Ca^{2+} , es sensible a la inhibición por glucocorticoides y por cicloheximida.

La comparación de la WGA con la PHA sugiere que estímulos que no son suficientes para generar las respuestas habituales en el sistema inmune, tales como proliferación o funciones efectoras específicas, bastan para inducir respuestas linfocitarias capaces de modificar el comportamiento de un tejido ajeno al sistema inmune: el tejido cardíaco.

Con el objeto de identificar los componentes proteicos del sobrenadante obtenido con tiempos intermedios o prolongados de estimulación que resultan activos en nuestro sistema, ensayamos el efecto del agregado de IFN α y de IFN γ a la preparación de aurícula aislada de rata. Ninguna de estas citoquinas fue capaz de modificar el comportamiento del tejido cardíaco per se o en presencia de araquidonato de sodio.

En cambio, incubando los sobrenadantes con un anticuerpo monoclonal dirigido contra IL-2, se observó una disminución del efecto estimulante de esos sobrenadantes. Esta inhibición sugiere que la IL-2 puede estar involucrada en el efecto estimulante. Precisamente, la IL-2 también se encuentra presente en sobrenadantes de estimulación linfocitaria de 18 y 48 horas (77).

Para comprobar la participación de esta linfoquina en la producción del efecto de estimulación contráctil, ensayamos 2 fuentes distintas de IL-2: una natural purificada a partir de sobrenadantes de estimulación de células mononucleares periféricas humanas, libre de lectina y de interferón γ y otra recombinante obtenida en levaduras por ingeniería genética. Ninguna de estas preparaciones fue capaz de generar por sí misma un efecto

inotrópico positivo sobre el tejido auricular. Sin embargo, en presencia de compuestos que pueden suministrar una señal adicional como el AA, sí se observó un efecto inotrópico positivo. La preincubación de cualquiera de las formas de IL-2 con el anticuerpo monoclonal anti-IL-2 impedía la producción de la actividad sobre la aurícula. En consecuencia podemos decir que el efecto descrito depende específicamente de la IL-2 y no de otra sustancia que pudiera contaminar la preparación de la IL-2 natural.

En sistemas de proliferación de linfocitos T dependientes de IL-2, tanto células periféricas humanas estimuladas por mitógenos como líneas celulares establecidas, se ha demostrado que la actividad de la IL-2 natural y la de la recombinante de origen bacteriano, es decir no glucosilada, son equivalentes (223). Por lo tanto, la actividad depende de la secuencia primaria de aminoácidos (223). En nuestros experimentos utilizamos IL-2 recombinante obtenida en levaduras que, aunque es glucosilada, puede ser diferente de la natural. De todos modos, ambas tuvieron un comportamiento similar en nuestro sistema, lo que hace suponer que las diferencias que pudieran presentar no son relevantes.

Para estimar la concentración de la IL-2 en el baño de reacción utilizamos como referencia la actividad específica de la IL-2r que es de 5000 U/ug linfoquina. Así, la concentración final de IL-2 (1 a 3 U/ml) resultó del orden de 10^{-11} M.

La IL-2 actúa fisiológicamente a través de receptores. Se han descrito 2 clases de receptores para IL-2: el de alta afinidad con un $K_d = 10^{-11}$ M, que es el que interviene en la actividad

proliferativa, y otro de baja afinidad con un $K_d = 10^{-9}M$ de función desconocida por el momento (80). Estaríamos entonces en presencia de una propiedad de la IL-2 que se manifiesta en el mismo rango de concentraciones que la actividad conocida cuando actúa como factor de crecimiento celular.

En otros sistemas en que dos señales actúan sinérgicamente, una concentración elevada de sólo uno de los estímulos es suficiente para provocar el efecto biológico (210). En nuestro modelo, cuando aumentamos la concentración de IL-2 al rango de 63 a 111 U/ml con el fin de evitar el requerimiento de la segunda señal, se observó un efecto inotrópico negativo directo. Sin embargo, en las condiciones experimentales empleadas es difícil interpretar este fenómeno que puede deberse, por lo menos en parte, a la imposibilidad de eliminar la albúmina empleada como factor estabilizante de las preparaciones de IL-2r e IL-2n.

La mayoría de los efectos conocidos de la IL-2 tales como la proliferación de líneas celulares que dependen de ella (224), la secreción de $IFN\ \gamma$ (225) y la producción de PGI_2 por cultivos de células endoteliales (226) no requieren otra señal más que la de la propia linfoquina. En cambio, la producción del efecto inotrópico positivo requiere un estímulo sinérgico. Dejando constante la concentración de AA y agregando acumulativamente IL-2 en alícuotas de 10 U cada una, se observa una respuesta dependiente de la cantidad de IL-2 añadida, que aumenta hasta estabilizarse en el valor obtenido con una concentración final de 20U/ml.

El mecanismo de acción de la IL-2 fue investigado por diver-

Los autores en sistemas de proliferación celular tanto en líneas de crecimiento continuo (224, 227) como en clones citotóxicos producidos experimentalmente para estudios de inmunorregulación (169, 170). En las líneas celulares continuas se observó que la unión de la IL-2 a su receptor tenía como consecuencia la activación y translocación de la PK-C (168) produciendo la fosforilación del propio receptor (165). En cambio, Cerottini y col. (169, 170) pudieron discriminar dos etapas en el caso de clones citotóxicos: la primera, de estimulación por el antígeno, era mediada a través de la PK-C mientras que la segunda, de respuesta a la IL-2, resultaba independiente del ciclo del fosfatidilinositol.

Teniendo en cuenta que el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} es un factor importante en la activación del ciclo del PI y de la PK-C, intentamos reemplazar la segunda señal dada por AA en nuestro sistema, por el ionóforo de Ca^{2+} A23187 empleándolo en concentraciones que no afectan por sí mismas el comportamiento de las aurículas. Al igual que el AA, el A23187 funcionó como señal sinérgica para el efecto de la IL-2 (FIGURA 23). La cooperación aportada por el AA podría ser directa (210) o producida por alguno de sus metabolitos activos (113, 114).

Con frecuencia se encuentran situaciones similares en otros sistemas. Así por ejemplo, por estimulación con ésteres de forbol en bajas concentraciones se logra la activación de la PK-C, en conjunto con ionóforos de calcio (160). En el caso de la línea HT-2, el LTB_4 , que puede actuar como ionóforo de calcio

(113, 114), coopera con cantidades subóptimas de IL-2 llevando la proliferación a niveles óptimos. En las plaquetas, Halenda y col. (228) observaron que la liberación de AA inducida por el A23187 puede incrementarse con acetato del ácido forbol mirístico y un diacilglicérido sintético a través de un mecanismo que involucra la activación de la PK-C.

En nuestro sistema, el pretratamiento de la aurícula con NCDC impidió la producción del efecto inotrópico positivo de la IL-2 tanto en presencia de AA como de A23187. El NCDC fue empleado originalmente como inhibidor de serin-esterasas, pero más recientemente (229) se describieron las condiciones en que se comporta como inhibidor de la fosfolipasa C impidiendo así la liberación del AA a partir de fosfolípidos. El diacilglicérido sintético OAG que logró reemplazar a la IL-2 en su efecto sinérgico con el AA o el A23187, no pudo ser bloqueado con NCDC. El OAG evitaría el requerimiento de activación de la PL C lo que explica que el NCDC sea efectivo sólo cuando se utiliza la linfoquina para obtener el efecto biológico (FIGURA 24). En la FIGURA 24 proponemos un modelo de acción de la IL-2 en el sistema estudiado.

Una situación análoga a la observada en este modelo in vitro podría darse en condiciones fisiológicas o patológicas en las que diversos estímulos pueden producir un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular o liberación de AA en el corazón cuando simultáneamente se encuentre presente IL-2. Como se discutió, bastan concentraciones muy bajas para obtener el efecto in vitro,

del mismo orden que las requeridas para la actividad fisiológica en proliferación (77).

En general, se admite que los efectos biológicos de la IL-2 se ejercen en un entorno restringido. La concentración sérica de IL-2 no es detectable ya que escapa los límites de sensibilidad de los ensayos habituales. Por otra parte, esta linfoquina no es liberada por células que no sufrieron una estimulación previa, lo que asegura un control en su producción.

En ciertas patologías como en la enfermedad de Chagas (181) y en la infección por virus Coxsackie (230) el corazón presenta infiltrados linfo-monocitarios. Los linfocitos que componen el infiltrado podrían ser activados y liberar localmente IL-2 alterando el comportamiento del músculo cardíaco. Por otro lado, en las terapias antitumorales con IL-2, llamadas de transferencia adoptiva (231), se ha observado una serie de efectos secundarios del tratamiento. Entre ellos se encuentran trastornos cardiovasculares (232) y arritmias que pueden terminar en infarto de miocardio (233). Debe destacarse que estos tratamientos se hacen con dosis masivas de IL-2, de modo que la concentración inicial en sangre sería muy elevada (del orden de 1000U/ml), pero esta linfoquina es rápidamente catabolizada (la vida media de la IL-2r humana una vez inyectada es breve y su "clearance" comienza a los 30 minutos (234)). De este modo podrían alcanzarse valores más cercanos a los de nuestro sistema.

J.E. Blalock (2, 235) propuso que el sistema inmune sería el "órgano" sensor para estímulos no cognitivos (virus, bacterias,

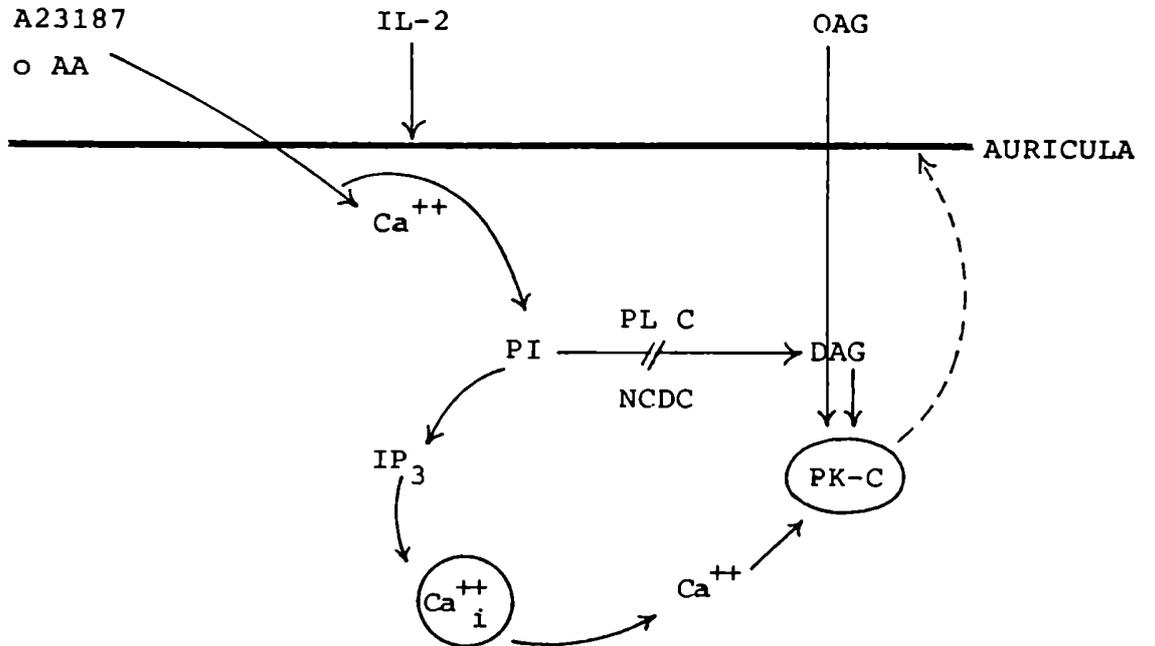
antígenos tumorales), utilizando señales y receptores comunes a otros. Este sistema transmitiría la información al sistema nervioso central y, a través de éste, a los distintos órganos, entre ellos el corazón. Otros autores han estudiado la relación del sistema inmune con la regulación neuroendócrina (1, 235, 236, 237, 238). La tendencia actual es integrar el conocimiento del organismo y su funcionamiento como un todo. Experimentalmente es más sencillo diseccionar las distintas partes, más aún cuando esas partes, como las células del sistema inmune, son capaces de llevar a cabo reacciones in vitro en forma aislada. No obstante, es necesario tener presente que en un individuo las células del sistema inmune se desarrollan y cumplen sus funciones en un medio que contiene otras células y factores solubles tales como hormonas, neurotransmisores, etc.

Los resultados de esta tesis indican que células del sistema inmune pueden producir factores capaces de modificar el comportamiento contráctil del tejido cardíaco. Para ello las células necesitan estar activadas, lo que ocurre con frecuencia en condiciones habituales. Sin embargo, el estímulo no precisa ser tal que induzca la proliferación linfocitaria. Como ocurre con la mayoría de las perturbaciones del estado de equilibrio, en un individuo sano no se observarán manifestaciones de estos efectos ya que el organismo pone en marcha los mecanismos necesarios para mantener la homeostasis. Fisiológicamente esta interacción tendría mayor importancia en circunstancias en que haya un contacto cercano entre las células efectoras y el tejido sensible al

efecto. Es lo que ocurre en las patologías que se presentan con infiltrados linfo-monocitarios como la enfermedad de Chagas (181) y podría llevar a alteraciones en el funcionamiento cardíaco.

FIGURA 24:

Modelo propuesto para el mecanismo de acción de la IL-2 sobre el tejido auricular



RESUMEN

En esta tesis se ha demostrado que la activación linfocitaria, ya sea de linfocitos sensibilizados in vivo en la enfermedad de Chagas o activados in vitro con estímulos inespecíficos, induce en la preparación de aurícula aislada de rata un efecto inotrópico positivo.

Este efecto es mediado por factores solubles linfocitarios capaces de inducir la generación de metabolitos de oxidación del ácido araquidónico por la vía de las lipoxigenasas.

Los productos solubles activos se acumulan gradualmente en los sobrenadantes linfocitarios. Estos sobrenadantes pueden ser generados con diversos estímulos: fitohemaglutinina (PHA), el ionóforo de calcio A23187 y aglutinina de germen de trigo (WGA). y para su obtención no se requiere la división celular.

Entre los compuestos activos presentes en los sobrenadantes se encuentran factores dializables de bajo peso molecular, entre ellos ácido araquidónico y/o alguno de sus metabolitos. En los sobrenadantes de 18 h o más se encuentra IL-2 que, en presencia de AA o un ionóforo de Ca^{2+} induce también un efecto inotrópico positivo. Esta actividad se ejercería a través del ciclo del fosfatidilinositol. Se trata de uno de los primeros efectos observados para la IL-2 fuera del sistema inmune.

Por lo tanto, se ha descrito un mecanismo a través del cual un acontecimiento esencial en la respuesta inmune, como es la activación linfocitaria, puede afectar el comportamiento de un tejido ajeno al sistema: el tejido cardíaco.

CONCLUSIONES

- En el modelo de sensibilización in vivo los linfocitos de pacientes chagásicos crónicos tienen espontáneamente un efecto inotrópico y cronotrópico positivo sobre la preparación auricular.
- Las células responsables del efecto son los linfocitos T.
- Este efecto es mediado por la SRS-A.
- Empleando una lectina mitogénica, la PHA, en un modelo de activación in vitro se puede reproducir el comportamiento de las células de los pacientes.
- Este efecto también es mediado por la SRS-A.
- Las células efectoras se encuentran en la población T.
- Se obtiene un efecto análogo con un ionóforo de calcio.
- También se produce un efecto semejante con WGA, lectina no mitogénica, por lo que no es necesaria la división celular.
- La generación del efecto sobre contractilidad cardíaca es más sensible que la proliferación celular a la acción de glucocorticoides, cicloheximida y verapamil.
- No se requiere contacto célula-célula durante el bioensayo. Se pueden obtener factores solubles capaces de generar el efecto en el tejido auricular.

- Los sobrenadantes de linfocitos estimulados contienen más de un compuesto activo: 1 o más componentes de bajo peso molecular y, para sobrenadantes de más de 18 h, IL-2.
- La IL-2 puede actuar sinérgicamente con AA o A23187 induciendo un efecto inotrópico positivo en el tejido auricular.
- Este efecto se produce probablemente a través del metabolismo del PI y con concentraciones de IL-2 del mismo orden que el rango fisiológico para proliferación.



ABREVIATURAS UTILIZADAS

PHA: fitohemaglutinina

WGA: aglutinina de germen de trigo

ConA: concanavalina A

AA: araquidonato de sodio

LT: leucotrieno

PG: prostaglandina

TX: tromboxano

IL-1: interleuquina 1

IL-2: interleuquina 2

IL-2 n: interleuquina 2 natural

IL-2 r: interleuquina 2 recombinante

IL-3: interleuquina 3

IFN: interferón

BCGF: factor de crecimiento para células B

BCDF: factor de diferenciación para células B

MIF: factor de inhibición de la migración

Ig: inmunoglobulina

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

L: linfocitos periféricos de dadores normales

Lch: linfocitos de pacientes chagásicos crónicos

Tch: Lch formadores de rosetas E

no Tch: Lch no formadores de rosetas E

Rosetas E: rosetas formadas por linfocitos con eritrocitos de carnero

HAR: homogenato de aurícula de rata

PI: fosfatidil inositol

PIP: fosfatidil inositol monofosfato

PIP₂: fosfatidil inositol difosfato

PIP₃: fosfatidil inositol trifosfato

PA: ácido fosfatídico

PL A : fosfolipasa A

PL C: fosfolipasa C

PK-C: proteína quinasa C

DAG: diacilglicérido

IP₃: inositol trifosfato

cGMP: 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina

GTP: trifosfato de guanosina

cAMP: 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina

ATP: trifosfato de guanosina

ARN: ácido deoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

SN: sobrenadante

SRS-A: sustancia de reacción lenta de la anafilaxia

NCDC: nitrocarboxifenil difenilcarbamato

OAG: oleil acetil diacilglicerol

ETYA: ácido 5,8,11,14- eicosatetraenoico

NDGA: ácido nordihidroguayarático

ASA: ácido acetilsalicílico

BIBLIOGRAFIA

1. Besedovsky H.O., del Rey A.E. and Sorkin E.
Immune-neuroendocrine interactions. *J. Immunol.* 135: 750s, 1985.
2. Blalock J.E., Harbour-Mc Menamin D. and Smith E.M.
Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems. *J. Immunol.* 135: 858s, 1985
3. Jerne N.K.
Toward a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.* - (Paris), 125C: 373, 1974.
4. Rabellino E., Colon S., Grey H.M., Unanue E.R.
Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. I Distribution and quantitation. *J. Exp. Med.* 133: 156, 1971.
5. Jondal M., Holm G., Wigzell H.
Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with SRBC. *J. Exp. Med.* 130: 207, 1972.
6. Kohler B. and Milstein C.
Continuous culture of fused cells secreting antibody of predetermined specificity. *Nature* 256: 495, 1975.
7. Reinherz E., Kung P.C., Goldstein G., Schlossman S.F.
Separation of functional subsets of human T-cells using monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*: 76: 4061, 1979.
8. Ballieux R.E. and Heijnen C.J.
Immunoregulatory T cell subpopulations in man: dissection by monoclonal antibodies and Fc-receptors. *Immunol. Rev.* 74: 5; 1983.
9. Shevach E.M.
Macrophages and other accessory cells. en " *Fundamental Immunology*", ed. por W.E. Paul, Raven Press, USA, 1984. p.71

10. Kay Roska A. and Lipsky P.E.
Dissection of the functions of antigen-presenting cells in the induction of T cell activation. J.Immunol. 135: 2953, 1985.
11. Farrar W.L., Mizel S.B., Farrar J.J.
Participation of lymphocyte activating factor (interleukin 1) in the induction of cytotoxic T cell responses. J.Immunol. 124: 1371, 1980.
12. Chang T.W., Testa D., Kung P.C., Ferry L., Dreskin H.J. and Goldstein G.
Cellular origin and interactions involved in γ -interferon production induced by OK13 monoclonal antibody. J.Immunol. 128: 585-589, 1982.
13. Bruszevsky W.B., Buszevski J.A., Tonnu H., Ferezy S.L., O'Brien R.L. and Parker C.W.
Early mitogen-induced metabolic events essential to proliferation of human T lymphocytes. Dependence of specific events on the influence of adherent accessory cells. J.Immunol. 132: 2837, 1984.
14. Williams J.M., Ransil B.J., Shapiro H.M. and Strom T.B.
Accessory cell requirement for activation, antigen expression and cell cycle progression by human T lymphocytes. J.Immunol. 133: 2986-2995, 1984.
15. Billiau A., Opdenaekker G., Van Damme J., De Ley M., Volckaert G. and van Beeumen J.
IL-1: aminoacid sequencing reveals microheterogeneity and relationship with an interferon-inducing monokine. Immunol.-Today 6: 235, 1985.
16. Smith K.A., Gillis S., Baker P.E., McKenzie D., Ruscetti F.W.
T-cell growth factor-mediated T-cell proliferation. Proc.-N.Y .Acad.Sci. 332: 423, 1979.

17. Ortaldo J.R., Gerard J.P., Henderson L.E., Neubauer R.H. and Rabin H.
Responsiveness of purified natural killer cells to pure interleukin-2 (IL-2). in "Interleukins, Lymphokines and Cytokines. ed. por J.J.Oppenheim y S.Cohen, Academic Press, USA, 1983, p.63.
18. Soberman R.J. and Karnovsky M.L.
Biochemical properties of activated macrophages. en Lymphokines Vol.3, ed.por E.Pick, Academic Press, USA, 1981, p.11.
19. Johnston R.B., Jr.
Enhancement of phagocytosis-associated oxidative metabolism as a manifestation of macrophage activation. en Lymphokines Vol.3, ed.por E.Pick, Academic Press, USA, 1981, p.33.
20. Fogler, W.E., Brandhorst J.S., Fidler I.J.
Differentiation between macrophage-activation factor and migration-inhibition factor in lymphokine preparations. en: "Interleukins, Lymphokines and Cytokines", ed.por J.J. Oppenheim y S.Cohen, Academic Press, USA, 1983, p.257.
21. Thurman G.B., Stull H.B. and Oldham R.K.
The effects of human interferon on the migration of guinea pig peritoneal exudate cells. en "Interleukins, Lymphokines and Cytokines", ed.por J.J.Oppenheim y S.Cohen, Academic Press, USA, 1983, p.277.
22. Glimcher L.H.
Genetic regulation of cell interactions and T cell recognition. II. Introduction. Fed.Proc.45: 2989, 1986.
23. Iada T.
Help, Suppression, and Specific Factors. en "Fundamental Immunology", ed.por W.E.Paul, Raven Press, USA, 1984, p.481.
24. Swain S.L.
T cell subsets and the recognition of MHC class. Immunol. Rev. 74: 129, 1983.

25. Zinkernagel R.M. and Doherty P.
MHC restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction, function and responsiveness. *Adv.Immunol.* 27: 51, 1979.
26. Schwartz R.H.
The role of gene products of the major histocompatibility complex in T cell activation and cellular interactions. en "Fundamental Immunology" ed.por W.E.Paul, Raven Press, USA, 1984, p.393.
27. Sachs D.H.
The major histocompatibility complex. en "Fundamental Immunology", ed.por W.E.Paul, Raven Press, USA, 1984, p.303.
28. Greaves M.F. and Bauminger S.
Activation of T and B lymphocytes by insoluble phyto-mitogens. *Nature New Biol.* 235: 67, 1972.
29. Nowell P.C.
Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of normal human lymphocytes. *Cancer Res.* 20: 462, 1960.
30. Walls E.V., Borghetti A.F., Benzic C.R. and Kay J.E.
Early events during activation of human lymphocytes by the mitogenic monoclonal antibody OKT3. *Cell.Immunol.* 89: 30, 1984.
31. Mitchell R.N.and Bowers W.E.
Cell surface glycoproteins of rat lymphocytes. I. Correlation of mitogenic stimulation by periodate or neuraminidase and galactose oxidase with the presence of papain-sensitive glycoproteins. *J.Immunol.* 121: 2181, 1978.
32. Crumpton M.J., Auger J., Green N.M. and Maino V.C.
Surface membrane events following activation by lectins and calcium ionophore. en "Mitogens in immunobiology, Oppenheim J.J., Rosenstreich D.L. Eds, Academic Press Inc., N.York, 1976, pp 85-101.

33. Ashman R.F.
Lymphocyte activation. en "Fundamental Immunology" ed.por W.E.Paul, Raven Press, N.York, 1984. pp 267-299.

34. Kristensen F., Walker C., Bettens F., Joncourt F. and de Weck A.L.
Assessment of interleukin 1 and interleukin 2 effects on cycling and noncycling thymocytes.Cell.Immunol. 74: 140, 1982.

35. Manger B., Weiss A., Weyand C., Goronzy J. and Stobo J.D.
T cell activation: differences in the signals required for IL-2 production by nonactivated and activated cells. J. Immunol. 135: 3669, 1985.

36. Klaus G.G.B.and Hawrylowicz C.M.
Cell-cycle control in lymphocyte stimulation. Immunol.Today 5: 15-19, 1984.

37. Sharon N. and Lis H.
Lectins: cell agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177: 949, 1972.

38. Larsson E.L. and Coutinho
The role of mitogenic lectins in T-cell triggering. Nature 280: 239, 1979.

39. Smith K.A., Lachman L.B., Oppenheim J.J. and Favata M.F.
The functional relationship of the interleukins. J.Exp.Med. 151: 1551, 1980.

40. Oppenheim J.J., Kovacs E.J., Matsushima K. and Durum S.K.
There is more than one interleukin 1. Immunol. Today. 7: 45, 1986.

41. Watson J. and Mochizuki D.
Interleukin 2: a class of T cell growth factors. Immunol. Rev. 51: 257, 1980.

42. Kaye J., Gillis S., Mizel S.B., Shevach E.M., Malek T.R., Dinarello C.A., Lachman L.B. and Janeway C.A.
Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptor: interleukin 1 is required for the expression of receptors for interleukin 2. *J. Immunol.* 133: 1339, 1984.
43. Scheurich P., Ucer U., Wrann M.E. and Pfizenmaier K.
Early events during primary activation of T cells: antigen receptor crosslinking and interleukin 1 initiate proliferative response of human T cells. *Eur. J. Immunol.* 15: 1091, 1985.
44. Kurt-Jones E.A., Virgin H.W. and Unanue E.R.
Relationship of macrophage Ia and membrane IL 1 expression to antigen presentation. *J. Immunol.* 135: 3652, 1985.
45. Kurt-Jones E.A., Beller D.I., Mizel S.B. and Unanue E.R.
Identification of a membrane associated interleukin 1 in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1204, 1985.
46. Larsson E.L.
Mechanism of T cell activation. II. Antigen- and lectin-dependent acquisition of responsiveness to TCGF is a non-mitogenic, active response of resting T cells. *J. Immunol.* 126: 1323, 1981.
47. Diamantstein I., Klos M. and Reimann J.
Studies on T-lymphocyte activation I. Is competence induction in thymocytes by phorbol myristate acetate, an accessory cell-independent event? *Immunology* 43: 183, 1981.
48. Williams J.M., Ransil B.J., Schapiro H.M. and Strom T.B.
Accessory cell requirement for activation antigen expression and cell cycle progression by human T lymphocytes. *J. Immunol.* 133: 2986, 1984.
49. Kristensen F., Walker C., Joncourt F., Bettens F. and de Weck A.L.
Human lymphocyte stimulation: I. Correlation between activated and proliferating T-lymphocytes. *Immunol. Lett.* 5: 59, 1982.

50. Sekaly R.P., Mac Donald H.R., Zaech P. and Nabholz M.
Cell cycle regulation of cloned cytolytic T cells by T cell growth factor: analysis by flow microfluorometry. *J.Immunol.* 129: 1407, 1982.
51. Boldt D.H., MacDermott R.P. and Jorolan E.P.
Interaction of plant lectins with purified human lymphocyte populations: binding characteristics and kinetics of proliferation. *J.Immunol.* 114: 1532, 1975.
52. Taylor D.S., Reed J.C. and Nowell P.C.
Stimulation and inhibition of human T cell subsets by wheat germ agglutinin. *J.Immunol.* 134: 3756, 1985.
53. Reed J.C., Robb R.J., Greene W.C. and Nowell P.C.
Effect of wheat germ agglutinin on the interleukin pathway of human T lymphocyte activation. *J.Immunol.* 134: 314, 1985.
54. Udey M.C., Chaplin D.D., Wedner J.H. and Parker C.W.
Early activation events in lectin-stimulated human lymphocytes: evidence that wheat germ agglutinin and mitogenic lectins cause similar early changes in lymphocyte metabolism. *J.Immunol.* 125: 1544, 1980.
55. Luckasen J.R., White J.G. and Kersey J.H.
Mitogenic properties of a calcium ionophore, A23187. *Proc. - Natl.Acad.Sci.USA* 71: 5088, 1974.
56. Kaplan J.G. and Owens T.
Activation of lymphocytes of man and mouse: monovalent cation fluxes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 339: 191, 1980.
57. Kiefer H., Blume A.J. and Kaback H.R.
Membrane potential changes during mitogenic stimulation of mouse spleen lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77: 2200, 1980.
58. Ashcroft F.M.
Ion channels in lymphocytes. *Immunol.Today* 5:232, 1984.

59. Yellen G.
The immune system uses ion channels, too. Trends in Neuro-
science 7: 179, 1984.
60. Schramm M. and Towart R.
Modulation of calcium channel function by drugs. Life-
Sciences 37: 1843, 1985.
61. Whitney R.B. and Sutherland R.M.
Characteristics of Ca^{2+} accumulation by lymphocytes and
alterations in the processing induced by phytohemagglutinin.
J.Cell Physiol. 82: 9, 1973.
62. Freedman M.H.
Early biochemical events in lymphocyte activation. I. Inves-
tigations on the nature and significance of early calcium
fluxes observed in mitogen-induced T and B lymphocytes.
Cell.Immunol. 44: 290, 1979.
63. Freedman N.H., Raff M.C. and Gomperts B.
Induction of increased calcium uptake in mouse I lymphocytes
by concanavalin A and its modulation by cyclic nucleotides.
Nature 255: 378, 1975.
64. Toyoshima S., Hirata F., Axelrod J., Beppu M., Osawa T. and
Waxdal M.J.
The relationship between phospholipid methylation and-
calcium influx in murine lymphocytes stimulated with native
and modified Con A.
65. Freedman M.H.
Investigations on the role of Ca^{2+} as a potential second
messenger for T and B lymphocyte activation and its re-
levance in DNA synthesis. en "Cell Biology and Immunolgy of
Leukocyte Function" ed. por M.R.Quastel, Academic Press,
N.York, pp 49-61.
66. Hirata F., Toyoshima S., Axelrod S. and Waxdal M.J.
Phospholipid methylation: a biochemical signal modulating
lymphocyte mitogenesis. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77: 862,
1980.

67. Moore J.P., Smith G.A., Hesketh T.R. and Metcalfe J.C.
Early increases in phospholipid methylation are not necessary for the mitogenic activation of lymphocytes. *J.Biol.-Chem.* 257: 8183, 1982.
68. Michell R.H.
Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim.Biophys.Acta* 415: 81, 1975.
69. Resch K., Ferber E., Odenthal J. and Fischer H.
Early changes in the phospholipid metabolism of lymphocytes following stimulation with PHA and with lysolecithin. *Eur. J.Immunol.* 1: 162, 1971.
70. Parker C.W., Kelly J.P., Falkenheim S.F. and Huber M.G.
Release of arachidonic acid from human lymphocytes in response to mitogenic lectins. *J.Exp.Med.* 149: 1487, 1979.
71. Chaplin D.D., Wedner H.J. and Parker C.W.
Protein phosphorylation in human peripheral blood lymphocytes: mitogen induced increases in protein phosphorylation in intact lymphocytes. *J.Immunol.* 124: 2390, 1980.
72. Lehninger A.L.
Biochemical aspects of hormone action: en "Biochemistry", Worth Publ., N.York, 1975. pp 811-812.
73. Parker C.W.
Role of cyclic nucleotides in regulating lymphocytes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 332: 255, 1979.
74. Gilman A.G.
G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 36: 577, 1984.
75. Udey M.C. and Parker C.W.
Membrane protein synthesis in mitogen-stimulated human T lymphocytes. *J.Immunol.* 126: 1106, 1981.

76. Wang T., Foker J.E. and Tsai M.Y.
The shift of an increase in phosphofructokinase activity from protein synthesis-dependent to independent mode during concanavalin A induced lymphocyte proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 13, 1980.
77. Robb R.J.
IL-2: the molecule and its function. *Immunol. Today.* 5: 203, 1984.
78. Andersson J., Gronvick K.O., Larsson E.L. and Coutinho A.
Studies on T lymphocyte activation. I. Requirements for mitogen dependent production of T cell growth factors. *Eur. J. Immunol.* 9: 581, 1979.
79. Lipkowitz S., Greene W.C., Rubin A.L., Novogrodsky A. and Stenzel K.H.
Expression of receptors for IL-2: role in the commitment of T lymphocytes to proliferate. *J. Immunol.* 132: 31, 1984.
80. Smith K.A.
The two-chain structure of high-affinity IL-2 receptors.- *Immunol. Today* 8:11, 1987.
81. Lowenthal J., Corthésy P., Tongue C., Lees R., Robson MacDonald H. and Nabholz M.
High and low affinity receptors: analysis by IL-2 dissociation rate and reactivity with monoclonal anti-receptor antibody PC61. *J. Immunol.* 135: 3988, 1985.
82. Tepperman K., Finer R., Donovan S., Elder R.C., Doi J., Katliff D. and Ng K.
Interleukin 2 regulates expression of its receptor and synthesis of gamma interferon by human T lymphocytes.- *Science* 225: 429, 1984.
83. Johnson H.M.
Mechanism of interferon γ production and assessment of immunoregulatory properties. en "Lymphokines" Vol.11, ed. por E.Pick, Academic Press, N.York, 1985. pp 33-46.

84. Krug U., Krug F. and Cuatrecasas P.
Emergence of insulin receptors on human lymphocytes during in vitro transformation. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 69: 2604, 1972.
85. Helderman J.H. and Strom T.B.
Specific insulin-binding sites on T and B lymphocytes as a marker of cell activation. Nature 274: 62, 1978.
86. Trowbridge I.S. and Omery M.B.
Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78: 3039, 1981.
87. Smith K.A.
Lymphokine regulation of T cell and B cell function. en "Fundamental Immunology" ed. por W.E.Paul, Raven Press, N.York, 1984. pp.559-576.
88. Torres B.A., Farrar W.L. and Johnson H.M.
Interleukin 2 regulates immune interferon (IFN γ) production by normal and suppressor cell cultures. J.Immunol. 128: 2217, 1982.
89. C.W.Parker
Mediators: release and function. en "Fundamental Immunology" ed.por W.E.Paul, Raven Press, USA, 1984, p.725.
90. Flower R.J. and Blackwell C.J.
The importance of phospholipase A₂ in prostaglandin biosynthesis. Biochem.Pharmacol. 25: 285, 1976.
91. Billah M.M., Lapetina E.G., Cuatrecasas P.
Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of platelets: association with 1,2-diacylglycerol-kinase and inhibition by cyclic AMP. Biochem.Biophys.Res.Commun.90:91, 1979.
92. Rittenboure-Simmons S.
Production of diglyceride from phosphatidyl-inositol in activated human platelets. J.Clin.Invest. 63: 580, 1979.

93. Lapetina E.G.
Regulation of arachidonic acid production: role of phospholipases C and A. Trends Pharmacol.Sci. 3: 115, 1982.
94. Billah M.M., Lapetina E.G., Cuatrecasas P.
Phospholipase A₂ and phospholipase C activities of platelets: differential substrate specificity, Ca²⁺ requirement, pH dependence and cellular localization. J.Biol.Chem. 255: 10227, 1980.
95. Borgeat P., Hamberg M., Samuelsson B.
Transformation of arachidonic acid and homo- ω -linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. J.Biol.Chem. 251: 7816, 1976.
96. Fruteau de Lacroix B., Braquet P., Borgeat P.
Characteristics of leukotriene (LT) and hydroxy eicosatetraenoic acid (HETE) synthesis in human leukocytes in vitro: effect of arachidonic acid concentration.
97. Nugteren D.H.
Arachidonate lipoxygenase in blood platelets. Biochim.Biophys.Acta 380: 299, 1975.
98. Gimeno A.L.
Leucotrienos y otros productos de lipoxigenasas. Naturaleza y perfil biológico. Acta Physiol.Pharmacol.Latinoam. 35: 67, 1985.
99. Kellaway H.C. and Trethewie E.R.
The liberation of a slow reacting smooth-muscle stimulating substance in anaphylaxis. J.Exp.Physiol. 30: 121, 1940.
100. Murphy K.C., Hammarstrom S. and Samuelsson B.
Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells. Proc.Natl.Acad.Sci.USA76: 4275, 1979.
101. Parker C.W., Jakschik B.A., Huber M.M. and Falkenhein S.F.
Characterization of slow reacting substance as a family of thiolipids derived from arachidonic acid. Biochem.Biophys. Res.Commun. 89: 1186, 1979.

102. Braquet P., Borgeat P., Etienne A. and Braquet M.
Stimulus-secretion coupling and leukotriene formation in the triggering of immediate hypersensitivity reactions. *Ann.-Inst.Pasteur Immunol.* 136: 186, 1985.
103. Appleton R.A., Bantick J.R., Chamberlain T.R., Hardern D.H., Lee T.B. and Pratt A.D.
Antagonists of slow reacting substance of anaphylaxis. Synthesis of a series of chromone-2-carboxylic acids. *J.Med.Chem.* 20: 371, 1976.
104. Falkenhein S.F., MacDonald H., Huber M.M., Koch D. and Parker C.W.
Effect of the 5-hydroperoxide of eicosatetraenoic acid and inhibitors of the lipoxygenase pathway on the slow reacting substance of rat basophilic leukemia cells. Direct evidence that slow reacting substance is a product of the lipoxygenase pathway. *J.Immunol.* 125: 163, 1980.
105. Downing D.T., Ahern D.G., Bactha M.
Enzyme inhibition by acetylenic compounds. *Biochem.biophys.-Res.Commun.* 40: 218, 1970.
106. Bokoch G.M. and Reed F.W.
Evidence for inhibition of leukotriene A₄ synthesis by 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid in guinea pig polymorphonuclear leukocytes. *J.Biol.Chem.* 256: 4156, 1981.
107. Borgeat P. and Samuelsson B.
Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: Effects of ionophore A23187. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76: 2148, 1979.
108. Goodwin J.S., Atluru D., Sierakowski S. and Lianos E.
Mechanism of action of glucocorticosteroids. Inhibition of T cell proliferation and interleukin 2 production by hydrocortisone is reversed by leukotriene B₄. *J.Clin.Invest.* 77: 1244, 1986.
109. Goetzl E.J.
Mediators of immune hypersensitivity derived from arachidonic acid. *New Engl.J.Med.* 303: 822, 1980.

110. Rola-Pleszczyński M., Borgeat P. and Sirois P.
Leukotriene B₄ induces human suppressor lymphocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 108: 1531, 1982.
111. Atluru D. and Goodwin J.S.
Control of polyclonal immunoglobulin production from human lymphocytes by leukotrienes: leukotriene B₄ induces an OKT8 (+), radiosensitive suppressor cell from resting human OKT8 (-) T cells. *J.Clin.Invest.* 74: 1444, 1984.
112. Rola-Pleszczyński M.
Differential effects of leukotriene B₄ on T4 + and T8 + lymphocyte phenotype and immunoregulatory functions. *J. Immunol.* 135: 1357, 1985.
113. Serhan C., Fridovich J., Goetzl E.J., Durham P.B. and Weissman G.
Leukotriene B₄ and phosphatidic acid are calcium ionophores. Studies employing arsenazo III on liposomes. *J.Biol.Chem.* 257: 4746, 1982.
114. Volpi M., Yassin R., Tao W., Molski T.F.P., Maccache P.H. and Sha'afi R.I.
Leukotriene B₄ mobilizes calcium without the breakdown of polyphosphoinositides and the production of phosphatidic acid in rabbit neutrophils. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81: 5966, 1984.
115. Goldman D.W., Gifford L.A., Marotti T., Koo C.H. and Goetzl E.J.
Molecular and cellular properties of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B₄. *Fed.Proc.* 46: 200, 1987.
116. Seaman W.E.
Human NK cell activity is reversibly inhibited by antagonists of lipoxygenation. *J.Immunol.* 131: 2953, 1983.
117. Jondal M., Kullman C., Rossi P. and Lindgren J.A.
Second messenger function of AA lipoxygenation products in human natural killer cell lysis? *Scand.J.Immunol.* 22: 285, 1985.

118. Carine K. and Hudig D.
Assessment of a role for phospholipase A_2 and arachidonic acid metabolism in human lymphocyte natural cytotoxicity. *Cell.Immunol.* 87: 270, 1984.
119. Gualde N., Rigaud M. and Goodwin J.
Induction of suppressor cells from peripheral blood T cells by 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (15-HPETE). *J. Immunol.* 135: 3424, 1985.
120. Goodman M.G. and Weigle W.D.
Modulation of lymphocyte activation I. Inhibition by an oxidation product of arachidonic acid. *J.Immunol.* 125: 593, 1980.
121. Bailey J.M., Bryant R.W., Low C.E., Pupilla M.B. and Vanderhoek J.Y.
Regulation of T-lymphocyte mitogenesis by the leucocyte product, 15-HETE. *Cell.Immunol.* 67: 112, 1982.
122. Vanderhoek J.Y., Bryant R.W. and Bailey J.M.
15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid. A potent and selective inhibitor of platelet lipoxygenase. *J.Biol.Chem.* 255: 5996, 1980.
123. Borgeat P., Fruteau de Laclos B., Picard S., Vallerand P. and Sirois P.
en: "Leukotrienes and other lipoxygenase products " (Eds. B.Samuelsson and R.Paoletti), Vol.9 Raven Press, N.York, 1982 p.45.
124. Vanderhoek J.Y., Tare N.S., Bailey J.M., Goldstein A.L. and Pluznik D.H.
New role of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid. Activator of leukotriene biosynthesis in PT-18 mast/basophil cells. *J.Biol.Chem.* 257: 12191, 1982.
125. Stenson W. and Parker C.W.
Monohydroxyeicosatetraenoic acid (HETEs) induce degranulation of human neutrophils. *J.Immunol.* 124: 2100, 1980.

126. Graff G., Stephenson J.H., Glass D.B., Haddox M.I. and Goldberg N.D.
Activation of soluble splenic cell guanylate cyclase by prostaglandin endoperoxides and fatty acid hydroperoxides. *J.Biol.Chem.* 253: 7662, 1978.
127. Serhan C.N., Hamberg M. and Samuelsson B.
Lipoxins: a novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc.Natl .Acad.Sci.USA* 81: 5335, 1984.
128. Salari H.
Immunological and non-immunological release of leukotrienes and histamine by guinea-pig heart. *Immunology* 58: 473, 1986.
129. Feniuk L., Kennedy I. and Whelan C.J.
Cardiovascular actions of leukotrienes C, D and E in the anaesthetised cat. *Leukotrienes and other lipoxygenase products.* Piper P.J.Ed. (J.Whiley, Chichester, 1983). p.108-112.
130. Levy R., Burke J.A. and Corey E.J.
SRS-A, leukotrienes and immediate hypersensitivity reactions of the heart. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research.* Samuelsson B., Faoletti R. and Ramwell P.Eds (Raven Press, N.York, 1983). Vol.12 pp 235-240.
131. Parker C.W.
Mediators: release and function. en "Fundamental Immunology", ed.por W.E.Paul, Raven Press, N.York, 1984. p. 731-734.
132. Scott W.A., Fawloski N.A., Murray H.W., Undreach M., Zreike J. and Cohn Z.A.
Regulation of arachidonic acid metabolism by macrophage activation.*J.Exp.Med.* 155: 1148, 1982.
133. Humes J.L., Bonney R.J. Felus L., Dahlgren M.E., Sadowski S.J., Kuehl F.A. Jr and Davies P.
Macrophages synthesize and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. *Nature* 269: 149-151, 1977.

134. Stenson W.F. and Parker C.W.
Prostaglandins, en "Immunopharmacology" ed.by P.Sirois and M.Rola-Pleszczynki. Elsevier/North Holland. Amsterdam, 1982.
135. Scheid M.P., Goldstein G., Hammerling U. and Byse E.A.
Lymphocyte differentiation from precursor cells in vitro.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 249: 531, 1975.
136. Bockman R.S.
Stage dependent reduction in T colony formation, coincidence with monocyte synthesis of prostaglandins. J.Clin.Invest. 66: 533, 1980.
137. Metzger Z., Hoffeld J.T. and Oppenheim J.J.
Macrophage-mediated suppression. I. Evidence for participation of both hydrogen peroxide and prostaglandins in suppression of murine lymphocyte proliferation. J.Immunol. 124: 983, 1980.
138. Morgan E.L., Hobbs M.V. and Weigle W.O.
Lymphocyte activation by the Fc region of immunoglobulin. I. Role of prostaglandins in the down regulation of Fc fragment-induced polyclonal antibody production. J.Immunol. 134: 2247, 1985.
139. Goodwin J.A., Wiik A., Lewis M., Bankhurst a.D. and Williams R.C.Jr.
High-affinity binding sites for prostaglandin E on human lymphocytes. Cell.Immunol. 43: 150, 1979.
140. Goldyne M.E. and Stobo J.D.
Immunoregulatory role of prostaglandins and related lipids. CRC Crit.Rev.Immunol. 2: 189, 1981.
141. Hamberg M. and Samuelsson B.
Prostaglandin endoperoxides. Novel transformation of arachidonic acid in human platelets. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71: 3400, 1974.
142. Ceuppens J.L., Vertessen S., Deckmyn H. and Vermylen J.
Effects of TXA₂ on lymphocyte proliferation. Cell.Immunol. 90: 458, 1985.

143. Rola-Pleszczyński M., Gagnon L., Bolduc D. and Le Breton G.
Evidence for the involvement of the thromboxane synthetase pathway in human natural cytotoxic cell activity. *J.Immunol.* 135: 4114, 1985.
144. Schultz G., Aktories K., Bohme E., Gerzer R. and Jacobs K.H.
Signal transformation mediated by membrane receptors for hormones and neurotransmitters. *Molec.Immunol.* 19: 1207, 1982.
145. Blalock J.E. and Stanton J.D.
Common pathways of interferon and hormonal action. *Nature* 283: 406, 1980.
146. Isakov N., Scholz W. and Altman A.
Signal transduction and intracellular events in T-lymphocyte activation. *Immunol.Today* 7: 271, 1986.
147. Nishizuka Y.
Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* 225: 1365, 1984.
148. Exton J.H.
Role of calcium and phosphoinositides in the actions of certain hormones and neurotransmitters. *J.Clin.Invest.* 75: 1753, 1985.
149. Berridge M.J. and Irvine R.F.
Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315, 1984.
150. Kikkawa U., Takai Y., Tanaka Y., Miyake R. and Nishizuka Y.
Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J.Biol.Chem.* 258: 11442, 1983.
151. Berridge M.J.
Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem.J.* 220: 345, 1984.
152. Ninnemann J.L.
Prostaglandins and Immunity. *I.Today* 5: 170, 1984.

153. Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U. and Nishizuka Y.
Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J.Biol.Chem.* 257: 7847, 1982.
154. Kraft A.S. and Anderson W.B.
Phorbol esters increase the amount of Ca^{2+} , phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature* 301: 621, 1983.
155. Streb H., Irvine R.F., Berridge M.J. and Schulz I.
Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306: 67, 1983.
156. Putney J.W.Jr, Aub D.L., Taylor C.W. and Merritt J.E.
Formation and biological action of inositol 1,4,5-trisphosphate. *Fed.Proc.* 45: 2634, 1986.
157. Michell B.
 Ca^{2+} and protein kinase C: two synergistic cellular signals. *Trends Biochem.Sci.* 8: 263, 1983.
158. Isakov N., Bleackley R.C., Shaw J. and Altman A.
Teleocidin and phorbol ester tumor promoters exert similar mitogenic effects on human lymphocytes. *Biochem.Biophys.-Res.Commun.* 130: 724, 1985.
159. Isakov N., Bleackley R.C., Shaw J. and Altman A.
The tumor promoter teleocidin induces IL-2 receptor expression and IL-2-independent proliferation of human peripheral blood T cells. *J.Immunol.* 135: 343, 1985.
160. Isakov N. and Altman A.
Tumor promoters in conjunction with Ca ionophores mimic antigenic stimulation by reactivation of alloantigen-primed-murine T lymphocytes. *J.Immunol.* 135: 3674, 1985.

161. Nishizuka Y.
The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308: 693, 1984.
162. Avissar S., Stenzel K. and Novogrodsky A.
Selective effects of TPA and IL-1 on protein phosphorylation in murine thymocytes. *Cell.Immunol.* 96: 462, 1985.
163. Monroe J.G. and Gaulton G.N.
Comparison of protein phosphorylation induced by mitogen and phorbol diester stimulation of murine T and B lymphocytes. *Surv.Immunol.Res.* 4: 192, 1985.
164. Farrar W.L. and Taguchi M.
Interleukin 2 stimulation of protein kinase C membrane association: evidence for IL-2 receptor phosphorylation. *Lymphokine Res.* 4: 87, 1985.
165. Shackelford D.A. and Trowbridge I.S.
Induction of expression and phosphorylation of the human interleukin 2 receptor by a phorbol diester. *J.Biol.Chem.* 259: 11706, 1984.
166. Shackelford D.A. and Trowbridge I.S.
Identification of lymphocyte integral membrane proteins as substrates for protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 261: 8334, 1986.
167. Cantrell D.A., Davies A.A. and Crumpton M.J.
Activators of protein kinase C down-regulate and phosphorylate the T3/T-cell antigen receptor complex of human T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82: 8158, 1985.
168. Farrar W.L. and Anderson W.B.
Interleukin-2 stimulates association of protein-kinase C with plasma membrane. *Nature.* 315: 233, 1985.
169. Harris D.T., Kozumbo W.J., Cerutti P. and Cerottini J.C.
Molecular mechanisms involved in T cell activation. I. Evidence for independent signal-transducing pathways in lymphokine production vs proliferation in cloned cytotoxic T lymphocytes. *J.Immunol.* 138: 600, 1987.

170. Kozumbo W.J., Harris D.T., Gromkowski S., Cerottini J.C. and Cerutti P.A.
Molecular mechanisms involved in T cell activation. II. The phosphatidyl-inositol signal-transducing mediates antigen-induced lymphokine production but not interleukin 2-induced proliferation in cloned cytotoxic T lymphocytes. *J.Immunol.* 138: 606, 1987.
171. Grabstein K., Dower S., Gillis S., Urdal D. and Larsen A.
Expression of interleukin 2, interferon γ and the IL 2 receptor by human peripheral blood lymphocytes. *J.Immunol.* 136: 4503, 1986.
172. Boron W.F.
Cell activation. The "basic" connection. *Nature* 312: 312, 1984.
173. Droge W.
Protein kinase C in T-cell regulation. *Immunol.Today* 7: 340, 1986.
174. Davis L. and Lipsky P.E.
Signals involved in T cell activation. I- Phorbol esters enhance responsiveness but cannot replace intact accessory cells in the induction of mitogen-stimulated T cell proliferation. *J.Immunol.* 135: 2946, 1985.
175. Michell B.
Oncogenes and inositol lipids. *Nature* 308: 770, 1984.
176. Whitman M., Kaplan D., Cantley L., Roberts T.M. and Scaffhausen B.
Phosphoinositide kinase activity and transformation. *Fed. Proc.* 45: 2647, 1986.
177. Grausz J.D., Fradelizi D., Dautry F., Monier R. and Lehn P.
Modulation of c-fos and c-myc mRNA levels in normal human lymphocytes by calcium ionophore A23187 and phorbol ester. *Eur.J.Immunol.* 16: 1217, 1986.

178. Reed J.C., Nowell P.C. and Hoover R.G.
Regulation of c-myc mRNA levels in normal human lymphocytes by modulators of cell proliferation. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82: 4221, 1985.
179. Storino R. y Milei J.
Miocardiopatía chagásica crónica. Un enfoque para el clínico general. Cap.1: Introducción y antecedentes históricos. Ed.Club de Estudio, Buenos Aires, 1986. pp. 1-10.
180. Chagas C.
Nova Tripanossomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n.gen. n. sp., agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. Mens.-Inst.Uswaldo Cruz 1: 157, 1909.
181. Cossio P., Laguens R.P., Kreutzer E., Diez C., Segal A., Arana R.
Chagasic cardiopathy: Immunopathologic and morphologic studies in myocardial biopsies. Am.J.Pathol. 86: 533, 1977.
182. Cunningham D.S., Grogil M. and Kuhn R.E.
Suppression of antibody responses in humans infected with Trypanosoma cruzi. Inf.Immunity 30: 476, 1980.
183. Cardoni R.L.
Respuesta Inmunológica. en " Miocardiopatía chagásica crónica. Un enfoque para el clínico general " ed.por Storino R. y Milei J., Ed.Club de Estudio, Bs As, 1986. Cap.3: pp.25-38.
184. Kierszenbaum F.
Is there autoimmunity in Chagas disease? Parasitol.Today 1: 4, 1985.
185. Toledo Barros M.A., Amado Neto V., Mendes E. and Mota I.
In vitro cellular immunity in Chagas' disease. Clin.Exp.-Immunol. 38: 376, 1979.
186. de la Vega M., Damilano G. and Diez C.
Leukocyte migration inhibition test with heart antigens in American Trypanosomiasis. J.Parasitol. 62: 129, 1976.

187. De Titto E. y Braun M.
Respuesta inmune al Trypanosoma cruzi. Un enfoque de patogé-
nia en la enfermedad de Chagas. Acta Physiol.Latinoamer. 35:
1, 1985.
188. Segura E.L., Cabeza Meckert P., Esteva M., Gelpi R., Campa-
nini A.R.de, Subias E. y Laguens R.P.
Acción de tracciones subcelulares de Trypanosoma cruzi
sobre la enfermedad de Chagas crónica en el ratón. I. Induc-
ción de cardiopatía en ausencia de infección. Medicina 40:
807, 1980.
189. Cossio P.M., Diez C., Szarfman A., Kreutzer E., Candiolo B,
Arana R.M.
Chagasic cardiopathy: demonstration of a serum gamma globu-
lin factor which reacts with endocardium and vascular struc-
tures. Circulation 49: 13, 1974.
190. Cossio P.M., Laguens R.P., Diez C., Szarfman A., Segal A,
Arana R.M.
Chagasic cardiopathy: antibodies reacting with plasma mem-
brane of striated muscle and endothelial cell. Circulation
50: 1252, 1974.
191. Szarfman A., Cossio P.M., Diez C., Arana R.M., Sadun E.
Antibodies against endocardium vascular structures and
interstitium of striated muscle that cross-react with Trypa-
nosoma cruzi and Trypanosoma rhodeniense. J.Parasitol. 60:
1024, 1974.
192. Khoury E., Ritacco V., Cossio P.M., Laguens R.P., Szarfman
A., Diez C., Arana R.M.
Circulating antibodies to peripheral nerve in American
trypanosomiasis (Chagas' disease). Clin.exp.Immunol. 36: 8,
1979.
193. Khoury E.L., Diez C., Cossio P.M., Arana R.M.
Heterophil nature of EVI antibodies in Trypanosoma cruzi
infection. Clin.Immunol.Immunopathol. 27: 283, 1983.
194. Khoury E.L. and Fields K.L.
Chagas' disease and autoimmunity. Lancet i, 1088, 1980.

195. Sterin-Borda L., Cossio P.M., Gimeno M., Diez C., Laguens R.P., Cabeza-Meckert P. and Arana R.M.
Effect of chagasic sera on the isolated rat atrial preparation: immunological, morphological and functional aspects. *Cardiovasc.Res.* 10: 613, 1976.
196. Sterin-Borda L., Canga L., Borda E., Cossio P.M., Diez C. and Arana R.M.
Chagasic sera alter the effect of ouabain on isolated rat atria. Participation of adrenergic mechanisms. *Eur.J.Pharmacol.* 69: 1, 1981.
197. Sterin-Borda L., Fink S., Diez C., Cossio P.M. and Bracco M.M.
Beta adrenergic effect of antibodies from chagasic patients and normal lymphocytes on isolated rat atria. *Clin.exp.Immunol.* 50: 534, 1982.
198. Sterin-Borda, Cantore M., Pascual J., Borda E., Cossio P.M., Arana R. and Passeron S.
Chagasic IgG binds and interacts with cardiac beta adrenoceptor-coupled adenylate cyclase system. *Int.J.Immunopharmacol.* 8: 581, 1986.
199. Kolb H., Toyka K.V. and Gleichmann E.
Histocompatibility antigens and chemical reactivity in autoimmunity. *I.Today* 8: 3, 1987.
200. Boyum A.
Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J.Lab.Invest.* 21 (Suppl.97): 77, 1968.
201. Rossum J.M.van
Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making and evaluation of drug parameters. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 143: 299, 1963.
202. Blomgren H.
Steroid sensitivity of the response of human lymphocytes to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen: role of phagocytic cells. *Scand.J.Immunol.* 3: 655, 1974.

203. de E.de Bracco M.M., Sterin-Borda L., Finiaz M., Cangiani S., Storino R., Diez C. and Borda E.
Modification of the contractile activity of isolated atria by T4 lymphocytes from patients with Chagas' disease: effect of soluble factors. *Intl.J.Immunopharmacol.* 8: 645, 1986.
204. Terashita Z., Fukui H., Hirata M., Terao S., Ohkawa S., Nishikawa K. and Kikuchi S.
Coronary vasoconstriction and PGI₂ release by leukotrienes in isolated guinea pig hearts. *Eur.J.Pharmacol.* 73: 357, 1981.
205. Letts L.G. and Piper P.J.
Cardiac actions of leukotrienes B₄, C₄, D₄ and E₄ in guinea pig and rat in vitro. en "Advances in prostaglandin, thromboxane and leukotriene research", Vol.11, ed.por B.Samuels-son, R.Paoletti, P.W.Ramwell, Raven Press, N.York, 1983, pp.391-395.
206. Hamberg M.
On the formation of thromboxane B₂ and 12L-hydroxy-5,8,10,-14-eicosatetraenoic (12ho-20:4) in tissues from guinea pig. *Biochim.Biophys.Acta* 431: 651, 1976.
207. Sterin-Borda L., Canga L., Pissani A. and Gimeno A.L.
Inotropic effect of FGE₁ and PGE₂ on isolated rat atria. Influence of adrenergic mechanisms. *Prostaglandins* 20: 825, 1980.
208. Burka J.F. and Paterson A.M.
The effects of SRS-A and histamine antagonists on antigen-induced contraction of guinea pig trachea. *Eur.J.Pharmacol.* 70: 489, 1981.
209. Yamamoto M., Taki N.A., Rapoport B. and Hinds W.E.
Modulation by thymus-derived (T) cells of thyroid cell stimulated prostaglandin E release by human peripheral blood mononuclear cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76: 6627, 1979.
210. McPhail L.C., Clayton C.C. and Snyderman R.
A potential second messenger role for unsaturated fatty acids: activation of Ca²⁺- dependent protein kinase. *Science* 224: 622, 1984.

211. Clevers H.C., De Bresser A., Kleinveld H., Gmelig-Meyling F.H.J. and Ballieux R.E.
Wheat-germ agglutinin activates human lymphocytes by stimulation of phosphoinositide hydrolysis. *J.Immunol.* 136: 3180, 1986.
212. Gelfand E.W., Cheung R.K., Grinstein S. and Mills G.B.
Characterization of the role for calcium influx in mitogen-induced triggering of human T cells. Identification of calcium-dependent and calcium-independent signals. *Eur.J. Immunol.* 16: 907-912, 1986.
213. Schapiro D.N., Adams B.S. and Niederhuber J.E.
Antigen-specific T cell activation results in an increase in cytoplasmic free Ca^{2+} . *J.Immunol.* 135: 2256, 1985.
214. Imboden J.B., Weiss A. and Stobo J.D.
The antigen receptor on a human T cell line initiates activation by increasing cytoplasmic free calcium. *J.Immunol.* 134: 663, 1985.
215. Blackwell G.J. and Flower R.J.
Inhibition of phospholipase. *Br.Med.Bull.* 39: 260, 1983.
216. Snyder D.S. and Unanue E.R.
Corticosteroids inhibit murine μ Ia expression and IL-1 production. *J.Immunol.* 129: 1803, 1982.
217. Smith K.A., Crabtree G.R., Kennedy S.J. and Munck A.
Glucocorticoid receptors and glucocorticoid sensitivity of mitogen stimulated and unstimulated human lymphocytes. *Nature* 267: 523, 1977.
218. Warren K.M. and Vogel S.N.
Opposing effects of glucocorticoids on IFN γ induced Fc receptor expression and Ia expression. *J.Immunol.* 134: 2462, 1985.
219. Obrig T.G., Culp W.J., McKeehan W.L. and Hardesty B.
The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J.Biol.Chem.* 246: 174, 1971.

220. Isturiz M.A. and Cardoni R.L.
The role of protein synthesis in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Cell.Immunol.* 31: 332, 1977.
221. Wititsuwannakul D. and Kim K.H.
Mechanism of glycogenolytic action of cycloheximide in rat liver. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 80: 1007, 1978.
222. Huerta-Bahena J., Villalobos Molina R. and Garcia Sainz A.
Cycloheximide: an adrenergic agent. *Life Sciences* 30: 1757, 1982.
223. Roifman C.M., Mills G.B. and Gelfand E.W.
Functional comparison of recombinant interleukin 2(IL-2) with IL-2-containing preparations derived from cultured cells.*Cell. Immunol.* 95: 146, 1985.
224. Smith K.A., Wang H.M. and Cantrell D.A.
The variables regulating T-cell growth. en "Progress in Immunology V" (V.Y.Yamamura and T.Tada Eds), Academic Press, N.York, 1983. pp.259-276.
225. Farrar W.L., Johnson H.M. and Farrar J.J.
Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2.*J.Immunol.* 126: 1120, 1980.
226. Hall E.R., Papp A.C., Seifert W.E. and Wu K.K.
Stimulation of endothelial cell prostacyclin formation by interleukin-2. *Lymphokine Res.* 5: 87, 1986.
227. Beckner S.K. and Farrar W.L.
Interleukin 2 modulation of adenylate cyclase: Potential role of protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 261: 3043, 1986.
228. Halenda S.F., Zavoico G.B. and Feinstein M.B.
Phorbol esters and oleoyl acetoxy glycerol enhance release of arachidonic acid in platelets stimulated by Ca^{2+} ionophore A23187. *J.Biol.Chem.* 255: 6024, 1985.

229. Walenga R., Vanderhoek J.Y. and Feinstein M.B.
Serine esterase inhibitors block stimulus-induced mobilization of arachidonic acid and phosphatidylinositide-specific phospholipase C activity in platelets. *J.Biol.Chem.* 255: 6021, 1986.
230. Woodruff J.F. and Woodruff J.J.
Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackievirus B3 heart disease. *J.Immunol.* 113: 1726, 1974.
231. Rosenberg S.A., Lotze M.T. and Muul L.M.
Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N.Eng.J.Med.* 313: 1485, 1985.
232. Parkinson D.R.
Current status of interleukin-2 and adoptive cellular immunotherapy in cancer treatment. *Current Concepts in Oncol.* 9: 11, 1987.
233. Merz B.
Antitumor strategies based on enhancing- and blocking-effects of interleukin-2. *J.Am.Med.Assoc.* 256: 1241, 1986.
234. Rosenberg S.A. and Lotze M.T.
Cancer immunotherapy using interleukin-2 and interleukin-2-activated lymphocytes. *Ann.Rev. Immunol.* 4: 681, 1986.
235. Blalock E.J.
The immune system as a sensory organ. *J.Immunol.* 132: 1067, 1984.
236. Fayan D.G. and Goetzl E.J.
Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J.Immunol.* 135: 783s, 1985.
237. Johnson H.M. and Torres B.A.
Regulation of lymphokine production by arginine vasopressin and oxytocin: modulation of lymphocyte function by neurohypophyseal hormones. *J.Immunol.* 135: 773s, 1985.

238. Smith E.M. and Blalock J.E.
Human lymphocyte production of ACTH and endorphin-like
substances: association with leukocyte interferon. Proc.-
Natl.Acad.Sci. USA 78: 7530, 1981.

