

Tesis de Posgrado

Mecanismos involucrados en la activación linfoide

Finiasz, Marta Regina

1989

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:

Finiasz, Marta Regina. (1989). Mecanismos involucrados en la activación linfoide. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2191_Finiasz.pdf

Cita tipo Chicago:

Finiasz, Marta Regina. "Mecanismos involucrados en la activación linfoide". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2191_Finiasz.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACION LINFOIDE

AUTORA: MARTA REGINA FINIASZ

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, 1989

2.192
Ej. 2

A mis padres

A Nicolás

A Sergio

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar en primer lugar mi agradecimiento a la Dra. María Marta de Elizalde de Bracco, quien a través de su calidez humana, capacidad científica y estímulo constante, me brindó la posibilidad de concretar este trabajo de tesis.

Agradezco a la Dra. Ana María Brunengo su valiosa cooperación como mi consejera de estudios.

Deseo agradecer a la Dra. Susana Goldstein de Fink, con quien compartí muchas horas de discusión y trabajo, su inestimable colaboración.

Quisiera agradecer a la Dra. Mirta Giordano su valioso aporte crítico, a las Dras. Isabel Piazzon, Graciela Serebrinsky y Mirta Schattner los momentos de discusión compartidos y a la Sra. Nilda Sotelo sus excelentes ilustraciones.

Agradezco la colaboración de la Srta. Marta Felippo y de la Sra. Gladys Rojas por su apoyo técnico y a la Sra. María Esperò-polo y a la Srta. Evelia Lopez por la preparación del material.

A todos mis compañeros del laboratorio un agradecimiento sincero por su apoyo, aliento y paciencia.

Este trabajo se realizó en la Sección Inmunología del "Instituto de Investigaciones Hematológicas" de la Academia Nacional de Medicina.

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
INDICE.....	4
INTRODUCCION	
1. LA RESPUESTA INMUNE.....	9
1.2. Características de los componentes celulares del sistema inmune.....	10
1.3. Colaboración celular en la respuesta inmune.....	14
2. ACTIVACION LINFOCITARIA.....	19
2.1. Acontecimientos asociados a las etapas tempranas de la activación linfocitaria.....	21
2.1.1. Alteraciones en el metabolismo de los fosfolípidos de membrana.....	24
2.1.2. Variación en los nucleótidos cíclicos.....	25
2.1.3. Activación del transporte de moléculas pequeñas.....	26
2.1.4. Cambios en el flujo de cationes monovalentes.....	27
2.1.5. Flujo de calcio.....	27
3. BIOLOGIA DE LOS EICOSANOIDES.....	30
3.1. Ácidos grasos precursores de los eicosanoides.....	30
3.2. Movilización del ácido araquidónico.....	31
3.2.1. Inhibición de la liberación del ácido araquidónico.....	33
3.3. Metabolismo del ácido araquidónico.....	34
3.3.1. Vía de la ciclooxigenasa.....	34
3.3.2. Vía de la lipoxigenasa.....	35
3.3.3. Vía de la epoxigenasa.....	35
3.4. Inhibición del metabolismo del ácido araquidónico.....	38

3.4.1.	Inhibición de la ciclooxigenasa.....	38
3.4.2.	Inhibición de la prostaciclina-sintetasa.....	39
3.4.3.	Inhibición de la tromboxano-sintetasa.....	39
3.4.4.	Inhibición de la lipoxigenasa.....	39
3.4.5.	Antagonistas de la acción de la SRS-A.....	40
3.5.	Regulación de la respuesta inmune por metabolitos del Ácido araquidónico.....	45
4.	LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA.....	52
4.1.	Ontogenia del linfocito B normal.....	53
4.2.	Fenotipo celular de la LLC-B.....	54
4.3.	Propiedades funcionales de las células de la LLC-B.....	55
5.	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
1.	Células efectoras.....	61
1.1.	Separación de distintas poblaciones celulares.....	62
1.1.1.	Eliminación de células adherentes.....	62
1.1.2.	Separación de linfocitos T y no T.....	62
1.1.3.	Separación de las subpoblaciones T colaboradora/induc- tora y T supresora/citotóxica por lisis selectiva con anticuerpos monoclonales y complemento.....	63
1.1.4.	Determinación de las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8.....	64
1.1.5.	Viabilidad celular.....	65
1.2.	Pacientes.....	65
1.3.	Línea celular Raji.....	66
2.	Preparación de aurícula aislada de rata.....	66

3.	Preparación de sobrenadantes libres de células.....	68
3.1.	Sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de linfocitos T y de subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8 activados con PHA.....	68
3.2.	Sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de la población total de linfocitos, de la población de linfocitos T, no T y de las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8 incubados con ácido araquidónico.....	68
4.	Ensayo de proliferación.....	69
5.	Curva de crecimiento de las células Raj1 en ausencia y en presencia de un inhibidor de la tromboxano sintetasa (L-8027).....	69
6.	Radioconversión de $[1-^{14}C]$ ácido araquidónico (AA*).....	70
7.	Radioinmunoanálisis (RIA) de TxB_2	71
8.	Soluciones empleadas.....	71
8.1.	Solución de Turk para conteo de linfocitos.....	71
8.2.	Solución para ensayo de viabilidad celular.....	72
8.3.	Fitoheماغلوتينina (PHA).....	72
8.4.	U-46619.....	72
8.5.	Araquidonato de Na (AA).....	72
8.6.	Anticuerpos monoclonales.....	72
8.7.	Inhibidores.....	73
9.	Expresión de los resultados.....	74

RESULTADOS

1.	MODIFICACION DE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DE LA AURICULA AISLADA DE RATA POR SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T HUMANOS NORMALES ACTIVADOS CON PHA.....	75
1.1.	Efecto de las subpoblaciones de linfocitos T sobre la contractilidad de la auricula de rata.....	75
1.1.2.	Mecanismos de la reacción de las subpoblaciones CD4-PHA y de CD8-PHA con la auricula aislada de rata.....	77
1.3.	Efecto de sobrenadantes libres de células activadas en la actividad contractil de la auricula de rata.....	78
2.	PAPEL DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN EL EFECTO INOTROPICO Y CRONOTROPICO INDUCIDO POR LINFOCITOS HUMANOS NORMALES.....	80
2.1.	Efecto de linfocitos tratados con AA sobre la contractilidad cardiaca.....	81
2.1.1.	Mecanismo de la reacción.....	81
2.2.	Curvas dosis-respuesta de AA en presencia y ausencia de linfocitos.....	82
2.3.	Efecto de inhibidores del metabolismo del AA en la acción del AA sobre la auricula de rata en ausencia de linfocitos.....	83
2.4.	Efecto de inhibidores del metabolismo del AA sobre la acción del AA en presencia de linfocitos.....	83
2.5.	Curva dosis-respuesta al AA en presencia de linfocitos humanos normales T y no T.....	84
2.6.	Curva dosis-respuesta al AA en presencia de subpoblaciones CD4 y CD8.....	84

2.7.	Efecto de sobrenadantes de linfocitos expuestos al AA en la tensión y frecuencia de la aúricula aislada de rata.....	85
2.8.	Efecto de sobrenadantes de subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8 expuestos al AA sobre la contractilidad cardiaca.....	85
2.9.	Efecto del AA sobre la proliferación de linfocitos humanos normales.....	86
3.	EFECTO DE CELULAS LEUCEMICAS Y LINFOBLASTOIDEAS SOBRE LA CONTRACTILIDAD CARDIACA.....	87
3.1.	Efecto de células leucémicas sobre la contractilidad cardiaca.....	87
3.2.	Efecto de células Raji sobre la contractilidad cardiaca.	88
3.2.1.	Efecto de inhibidores de la síntesis de Tromboxanos y Prostanoides sobre las células Raji.....	88
3.2.2.	Efecto del L-8027 (inhibidor de la tromboxano sin tetasa) sobre el crecimiento de la línea celular Raji...	89
3.3.	Producción de metabolitos del AA por células Raji y de LLC-B.....	89
3.4.	Determinación de Tromboxanos por RIA.....	90
	DISCUSION.....	91
	CONCLUSIONES.....	116
	RESUMEN.....	119
	ABREVIATURAS.....	120
	BIBLIOGRAFIA.....	123

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION

1. LA RESPUESTA INMUNE

Los vertebrados poseen un sistema inmune extremadamente complejo que les permite reaccionar ante los agentes infecciosos, poniendo en juego mecanismos específicos e inespecíficos de defensa. Los mecanismos inespecíficos que constituyen la primera línea de defensa del organismo involucran a las células fagocíticas mononucleares (monocitos y macrófagos) y a los leucocitos polimorfonucleares. El sistema complemento, formado por un conjunto de proteínas presente en el suero de los vertebrados, constituye asimismo un mecanismo efector inespecífico que interviene en diversas reacciones inmunológicas.

El sistema inmune en el hombre, involucra una serie de eventos regulatorios interrelacionados que le confieren un alto grado de autonomía. El rol más importante de esta regulación es prevenir que se establezca una respuesta inmune contra moléculas del medio interno. Es decir que el sistema inmune puede discriminar lo propio de lo extraño para reaccionar únicamente contra éste último. A tal efecto, utiliza un elaborado sistema de reconocimiento específico que involucra a los linfocitos T y B y a factores solubles, denominados genéricamente interleuquinas, que cumplen un papel fundamental en la comunicación entre las células del sistema inmune. Estos factores (linfoquinas y monoquinas)

son hormonas elaboradas por los linfocitos y monocitos o macrófagos y actúan sobre otras células del sistema inmune, regulando inespecíficamente sus funciones. La interleuquina 1 (IL-1) (1) es una monoquina que aumenta la capacidad de respuesta de las células T a mitógenos y antígenos. La interleuquina 2 (IL-2) (2) es una linfoquina que promueve la proliferación de las células que poseen receptores de IL-2 de alta afinidad.

1.2. Características de los componentes celulares del sistema inmune.

En los mamíferos, los linfocitos (L) se diferencian en la médula ósea o en el timo, recibiendo la denominación de linfocitos B (LB) o linfocitos T (LT) respectivamente. Aunque son similares en su morfología, difieren fundamentalmente en sus funciones. Los LB son precursores de los plasmocitos, que son las células productoras de anticuerpos, mientras que los LT actúan como células efectoras, colaboradoras o supresoras. Tanto los LB como las distintas subpoblaciones de LT pueden ser diferenciados unos de otros por marcadores expresados en su superficie y por sus respuestas a ciertos mitógenos.

Los linfocitos adquieren en el curso de su diferenciación características distintivas que en muchos casos son independientes de su función. Estos marcadores son moléculas expresadas en la superficie celular, denominadas antígenos (Ag) de superficie y pueden ser detectadas por anticuerpos dirigidos contra ellas.

Estos anticuerpos, conjuntamente con el complemento, pueden ser utilizados para eliminar las células que los expresan.

Como la expresión de algunos de los antígenos de superficie correlaciona con el estadio de diferenciación de los linfocitos, se los denomina antígenos de diferenciación. Los antígenos de diferenciación de las células T constituyen un valioso instrumento para su identificación, caracterización y análisis. En la actualidad se utilizan los anticuerpos monoclonales (3) para detectar los marcadores de superficie del linfocito. Muchos anticuerpos monoclonales, producidos por diversos autores independientemente, identificaban al mismo antígeno. Por tal motivo el "Primer Taller Internacional sobre Diferenciación de Leucocitos Humanos", realizado en París en 1982, caracterizó por inmunofluorescencia 139 anticuerpos monoclonales dirigidos contra determinantes antigénicos de leucocitos. Los anticuerpos se agruparon en "clusters" o grupos de acuerdo a los resultados obtenidos. El Subcomité de Nomenclatura del "5to Congreso Internacional de Inmunología" llevado a cabo en Tokio, Japón en 1983, adoptó la denominación "cluster de diferenciación (CD)", para agrupar así a todos los anticuerpos conocidos que reaccionaban con las subpoblaciones identificables (4).

Los antígenos de membrana de los linfocitos T humanos aparecen en ciertos estadios de su diferenciación (5) (FIGURA 1). Durante el ESTADIO 1, se expresa, además del Ag T10 (CD38) que no es linaje específico, el Ag T11 (CD2) que está asociado a la unión de eritrocitos de carnero a la superficie del LT, fenómeno

que es ampliamente utilizado para identificar y separar LT humanos. Este Ag se expresa a lo largo de todo el periodo de diferenciación y está involucrado en la activación T independiente del contacto con el antígeno. También, durante este estadio se expresa el Ag T1 (CD5). En el ESTADIO 2 se expresa el Ag T6 (CD1), al mismo tiempo que ambos Ags T4 (CD4) y T8 (CD8). Las células en los ESTADIOS 1 y 2 se localizan en la corteza del timo. A medida que transcurre la maduración y las células se convierten en linfocitos medulares pierden el Ag T6 (CD1) y también el Ag T10 (CD38). Al ingresar en el ESTADIO 3, expresan ya sea el Ag T4 (CD4) o el Ag T8 (CD8), además del Ag T3 (CD3) que está asociado al receptor T para el antígeno. Los LT no son inmunológicamente funcionales en los estadios 1 y 2; en el estadio 3 adquieren la inmunocompetencia en asociación con la aparición del Ag T3 (CD3). Los antígenos CD6 y CD7 también se expresan en los linfocitos de progenie T (3). El 70% de los linfocitos periféricos humanos son: T1⁺ (CD5⁺), T3⁺ (CD3⁺) y T11⁺ (CD2⁺). El Ag T4 (CD4), que identifica a la subpoblación inductora/colaboradora, está presente en el 55-60% de los LT; mientras que el Ag T8 (CD8), que identifica a la subpoblación citotóxica/supresora, está presente en el 20-30% (5).

Tal como se ha descrito anteriormente, las células T poseen una gran variedad de antígenos de diferenciación que no sólo se utilizan para definirlos sino como indicadores de sus funciones. El criterio absoluto para definir una célula B, cuya función primordial es la producción de anticuerpos, es la presencia de

inmunoglobulina de superficie. El linfocito B también expresa otros marcadores que lo diferencian del linfocito T. El receptor del fragmento C3 del complemento es uno de ellos, así como un receptor que se une a la porción Fc de la molécula de IgG. Las células de progenie B poseen un amplio rango de antígenos de diferenciación, los cuales serán descritos en el punto 4 de esta introducción.

Existe una población de linfocitos granulares que no son ni linfocitos T ni linfocitos B. Se caracterizan por poseer receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G (IgG). Comparten algunas características con los monocitos y expresan algunos marcadores de células T. Actualmente se cree que dentro de esta población celular, se hallan la mayoría de las células denominadas "agresoras naturales" (células NK), que portan el antígeno CD16 (6,7), así como las células efectoras de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (células K) (8). Las células NK lisan inespecíficamente a las células tumorales y a las infectadas por virus. Las células K lo hacen a través del anticuerpo unido a la célula blanco.

La función efectora primordial de los fagocitos mononucleares, que comprenden a los monocitos y macrófagos, consiste en la ingestión de partículas extrañas y su posterior degradación intracelular. Los receptores para el componente C3b del complemento y para el fragmento Fc de la IgG facilitan el reconocimiento de la partícula cuando está recubierta por el anticuerpo IgG y/o complemento (9).

El procesamiento y presentación antigénica y la secreción de factores solubles, que actúan sobre otras células como la IL-1, y el interferón α son otras importantes funciones llevadas a cabo por el macrófago (9,10).

1.3. Colaboración celular en la respuesta inmune

Las respuestas inmunes humorales y celulares fueron consideradas durante mucho tiempo como dos mecanismos independientes. Según esta concepción, el compartimiento celular B era el productor de anticuerpos, mientras que el conjunto de células T mediaba la reacción inmune celular. En la actualidad, está ampliamente comprobado que para que la respuesta inmune específica tenga lugar, es necesario que todas las poblaciones celulares, inclusive los macrófagos, interactúen (FIGURA 2).

Dos grandes poblaciones de linfocitos intervienen en la respuesta efectora hacia el antígeno: los linfocitos B que producen anticuerpos dirigidos a cada uno de sus determinantes antigénicos y los linfocitos T citotóxicos (Tc) que lisan células sobre cuya membrana se expresan antígenos no propios, por ejemplo antígenos virales o aloantígenos (11). Por otro lado, existen células T reguladoras de dos tipos: cooperadoras (Th) o supresoras (Ts), que actúan controlando positivamente o negativamente el funcionamiento tanto de las células T efectoras como el de los linfocitos B (12). En los últimos años se ha descrito otra subpoblación de células T llamadas T contrasupresoras; su función consiste en

regular la actividad de las Ts actuando sobre las Th, las cuales se tornan refractarias a la señales supresoras de las Ts (13).

Para que la cooperación celular sea posible, es necesario que las células T reconozcan al antígeno extraño asociado a antígenos propios denominados Antígenos Mayores de Histocompatibilidad (14), expresados en la superficie de las células con las que debe interactuar. Las células Th, que generalmente son de fenotipo CD4, reconocen al antígeno como extraño sólo si éste está asociado a antígenos de histocompatibilidad de Clase II; en cambio las células Tc, de fenotipo CD8, no reaccionan frente al antígeno aislado sino asociado a antígenos de histocompatibilidad de Clase I (15,16).

Cuando una sustancia extraña, por ejemplo: un antígeno (bacteria, virus, proteína, sustancia química, toxina) penetra en el organismo, el macrófago y otras células presentadoras de antígenos procesan y presentan el antígeno al linfocito Th al mismo tiempo que liberan IL-1. Es así como el macrófago ejerce su función accesoria proveyendo al menos dos señales al linfocito Th: presentación del antígeno en el contexto de antígenos de histocompatibilidad de Clase II y activación por IL-1. En presencia de la doble señal Ag-IL-1, los linfocitos Th producen IL-2 que promueve la proliferación de células T y la secreción de otros mediadores de la respuesta como MIF (factor de inhibición de la migración de macrófagos), $IFN\gamma$, IL-4 (antes BCGF, BSF-1), IL-5 (antes BCGF II) e IL-6 (antes BCDF, BSF-2) (17,18). Los productos secretados por los linfocitos Th activados pueden modu-

lar la actividad de todas las células que intervienen en la respuesta inmune, ya sean linfocitos Ts, Tc, Th, linfocitos B o macrófagos. Asimismo, los macrófagos producen factores que pueden suprimir inespecíficamente la actividad linfocitaria como prostaglandinas, $IFN\alpha$ y metabolitos tóxicos del oxígeno (10,19,20).

FIGURA 1

Ontogenia del linfocito T

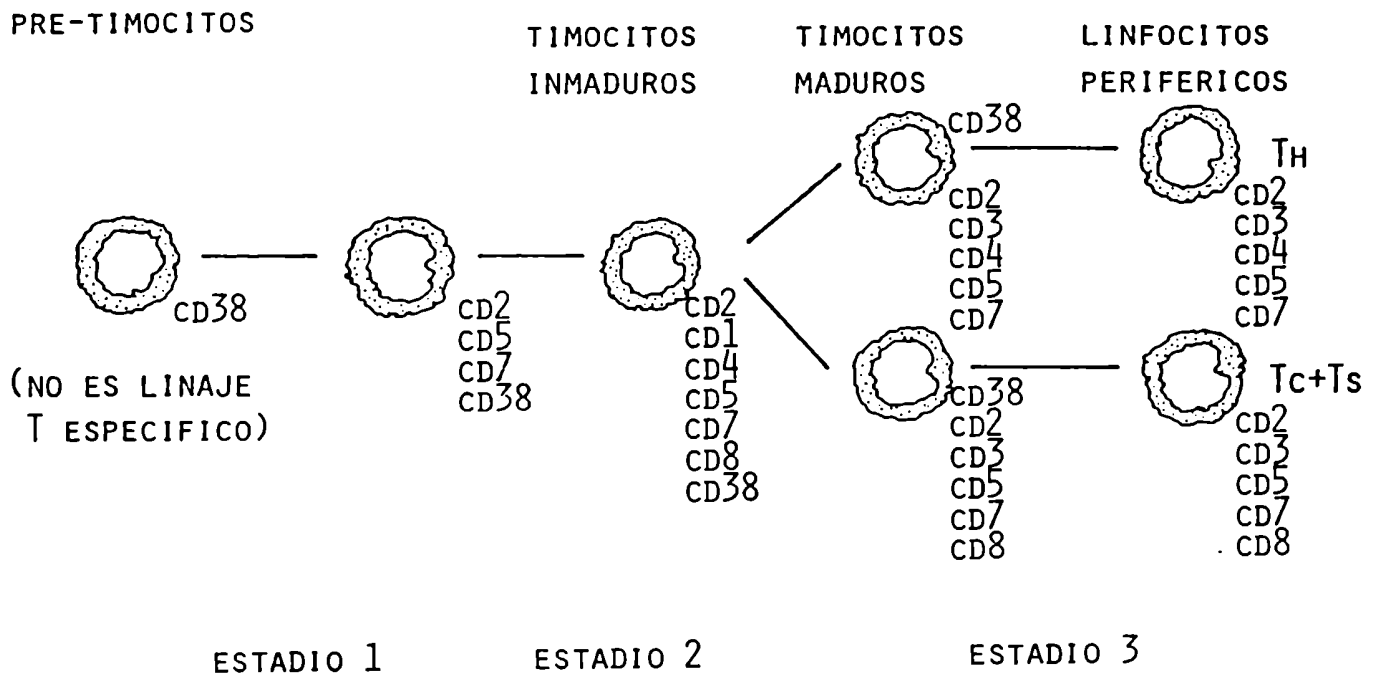
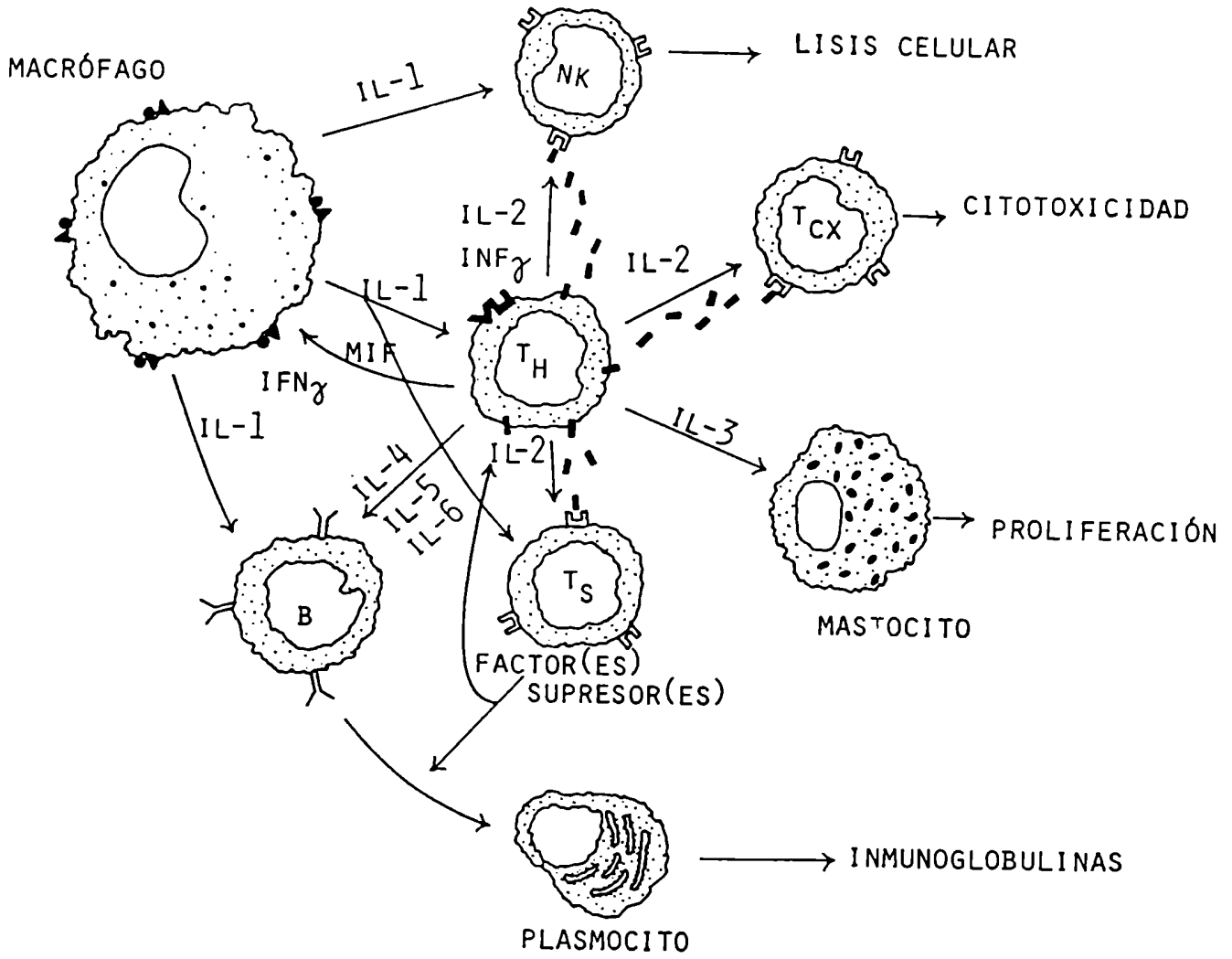


FIGURA 2

Interacciones celulares en la respuesta inmune



2. ACTIVACION LINFOCITARIA

La activación de linfocitos involucra una compleja serie de cambios metabólicos que culminan con la síntesis de ADN, división celular y cambios morfológicos característicos de las formas más indiferenciadas de la célula linfoide. Estos cambios se conocen como transformación blástica o blastogénesis. Los cambios moleculares que ocurren están relacionados con las funciones inmunológicas de estas células.

La activación linfocitaria constituye un valioso modelo para el estudio de los mecanismos mediante los cuales las células en reposo son inducidas a proliferar o a diferenciarse.

Los parámetros evaluados en la mayoría de los estudios son la división celular (o síntesis de ADN) y el desarrollo de una función efectora (síntesis de anticuerpos, secreción de linfoquinas o citotoxicidad).

El proceso de activación linfocitaria, comienza con la unión de una variedad de agentes activantes específicos (antígenos presentados en el contexto de los antígenos mayores de histocompatibilidad) e inespecíficos (lectinas y otros ligandos), a los receptores de superficie de la membrana plasmática. La unión de antígenos, anticuerpos y lectinas a las células linfoides induce una secuencia de acontecimientos que no siempre llevan a la etapa final, siendo la respuesta de la célula característica de la clase de linfocito.

Uno de los mayores problemas para el estudio de las bases

bioquímicas de la activación linfocitaria por antígenos, lo constituye el hecho de que sólo una pequeña porción de la población linfoide (aproximadamente 0,1%) participa. Sin embargo la existencia de una variedad de mitógenos inespecíficos, que estimulan varios clones independientemente de su especificidad antigénica permite analizar, en términos moleculares, qué sucede cuando los linfocitos humanos son inducidos a proliferar. Los linfocitos activados policlonalmente por mitógenos se comportan en forma análoga a las células estimuladas por antígenos.

Los ligandos policlonales más comúnmente usados son las lectinas que constituyen un grupo de glucoproteínas, derivadas de plantas y animales, con capacidad para unirse a carbohidratos. Las lectinas utilizadas más frecuentemente para estimular a los linfocitos T, son la fitohemaglutinina (PHA) (21) con especificidad para residuos de N-acetil galactosamina y la concanavalina A (Con A) (22) que se une a manósido. Otros mitógenos, como el lipopolisacárido (LPS) (22) derivado de la pared celular de *Escherichia coli* o *Brucella abortus*, estimula sólo a las células B para inducir su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Unos pocos mitógenos pueden, aparentemente, estimular a ambas poblaciones B y T. Entre éstos se encuentran la lectina del pokeweed (PWM) (22) y la proteína A (23), que es un componente de la membrana de *Staphylococcus aureus*. Algunas lectinas, como la aglutinina de germen de trigo (WGA) (24), pueden inducir varios de los pasos metabólicos iniciales de la activación sin llegar a la división celular.

Existen además un gran número de otras sustancias que activan linfocitos humanos inespecíficamente, entre ellos se encuentran enzimas proteolíticas, cationes divalentes, ionóforos de Ca^{2+} , tal como el A 23187, que transportan Ca^{2+} extracelular a través de las membranas biológicas y agentes oxidantes como el periodato (22.25).

Los acontecimientos que ocurren luego de la activación linfocitaria se caracterizan por alteraciones de la membrana, el citoplasma y el núcleo. Algunos de estos cambios moleculares pueden detectarse pocos segundos después del contacto con el ligando, mientras que otros suceden horas o días más tarde.

Se describirán con más detalle los eventos tempranos de la activación linfocitaria, dado que este aspecto está relacionado con las observaciones experimentales.

2.1. Acontecimientos asociados a las etapas tempranas de la activación linfocitaria

Los eventos iniciales, que ocurren segundos o minutos después de la activación linfoide, se caracterizan principalmente por alteraciones en la estructura y función de la membrana. Muchos de estos cambios aparentemente no requieren síntesis de novo de proteínas ya que son insensibles al tratamiento previo con inhibidores de la síntesis proteica. Podrían ser mediados únicamente por modificaciones en la estructura de la membrana celular.

Las membranas celulares están compuestas principalmente por lípidos y proteínas (26). La membrana plasmática del linfocito contiene un 50% de lípidos, la mayoría de los cuales son fosfolípidos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. Un porcentaje menor son lípidos neutros (colesterol) y glucolípidos (gangliósido, esfingomieli-
na). Estos compuestos se distribuyen adoptando la configuración más favorable energéticamente (27).

El grueso de los lípidos de membrana, se ordenan formando una doble capa lipídica con las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos extendidas dentro de la membrana en forma perpendicular a la superficie y con los grupos polares orientados hacia el exterior formando un ambiente hidrofílico. En consecuencia, el agua y los iones quedan excluidos del interior hidrofóbico de la membrana y los grupos polares interactúan con el medio acuoso externo e interno de la célula (28).

Las moléculas lipídicas difunden en forma libre en el plano de cada capa pero raramente pueden trasladarse desde la capa interna hacia la externa y viceversa.

La fluidez de la membrana depende de la temperatura y de la naturaleza de las cabezas polares y de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. Esta puede ser disminuida aumentando la relación ácido graso saturado/ácido graso no saturado, esfingomieli-
na/fosfatidilcolina o colesterol/fosfolípidos (29).

Respecto a las proteínas de membrana, existen básicamente dos tipos: las llamadas integrales que se encuentran intercaladas

dentro de la doble capa fluida lipídica a distintas profundidades dependiendo de la secuencia de aminoácidos y del plegamiento tridimensional y las proteínas periféricas que no parecen ser esenciales para las funciones estructurales básicas (26). Algunas proteínas integrales pueden atravesar la membrana, dejando secuencias de péptidos hidrofílicos tanto del lado externo como del lado citoplasmático .

El contenido de hidratos de carbono de la membrana plasmática representa más del 10% de la masa total. La membrana plasmática es asimétrica tanto en el plano horizontal como en el vertical. Esta asimetría de las membranas constituye un elemento importante en el mecanismo de los procesos de transporte a través de las mismas. Las glucoproteínas y glucolípidos se disponen de tal forma que los residuos de hidratos de carbono quedan expuestos exclusivamente hacia la cara externa de la membrana celular donde funcionarían como receptores específicos de anticuerpos, hormonas, lectinas, virus y otros ligandos.

En la actualidad existen evidencias que sugieren que el primer paso de la activación de linfocitos por antígenos, lectinas y anticuerpos consiste en el entrecruzamiento de receptores específicos expuestos en la superficie celular (30). Esta interacción ligando-receptor modificaría al receptor estimulando así la transferencia de información a través de la membrana hacia el interior de la célula.

2.1.1. Alteraciones en el metabolismo de los fosfolípidos de membrana

La activación de las metiltransferasas de membrana que catalizan la transferencia de grupos metilo de la S-adenosilmetionina a la fosfatidiletanolamina generando fosfatidilcolina es uno de los eventos bioquímicos más tempranos luego de la estimulación mitogénica (31). Se observó que la metilación de los fosfolípidos está asociada a una reducción de la viscosidad de la membrana y a la formación de un canal transitorio para el calcio (32). La entrada de calcio es un requisito para la activación de la fosfolipasa A₂ de membrana que libera a los ácidos grasos de la posición 2 de los fosfolípidos. Uno de los ácidos grasos liberados por la fosfolipasa A₂, durante la activación linfocitaria, es el ácido araquidónico (AA) del cual se dará mayor información más adelante.

En los linfocitos estimulados con PHA se observa una activación de la acyl-CoA transferasa cuya función es la reincorporación de los ácidos grasos no saturados (AA y ácido linoleico) a la posición 2 de la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (27).

La síntesis de novo de fosfatidilcolina y la incorporación de colina a los fosfolípidos también se acelera luego de la estimulación mitogénica. Existen evidencias que demuestran que el recambio de los fosfolípidos de membrana excede en magnitud a la síntesis de novo de los mismos, durante la activación (27).

Una respuesta característica de una gran variedad de células a diversos estímulos es acelerar el recambio del fosfatidilinositol. El fosfatidilinositol representa alrededor del 10% de los fosfolípidos de la membrana celular. En linfocitos estimulados la fosfolipasa C, que es una enzima dependiente de bajas concentraciones de calcio, convierte al fosfatidilinositol en 1,2 diacilglicerol (DAG) y fosfatos de inositol. El inositol trifosfato (IP3) se forma a partir del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato y actúa como un movilizador del calcio intracelular. Se ha descrito una quinasa (proteína quinasa C) que es activada por diacil-glicerol y calcio (34,35).

Recientemente se ha demostrado que la generación de DAG a partir de la fosfatidilcolina, por acción de una fosfolipasa C insensible al Ca^{2+} o de una fosfolipasa D, es cuantitativamente mayor que la obtenida a partir del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato. En consecuencia la hidrólisis de la fosfatidilcolina tendría una gran relevancia en la regulación de la proteína quinasa C y probablemente sobre otras funciones celulares (36,37).

2.1.2. Variación en los nucleótidos cíclicos

En una gran variedad de tipos celulares las señales regulatorias de hormonas y otros ligandos son transmitidas al interior de la célula por medio del 3'5' monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) o del 3'5' monofosfato cíclico de guanosina (GMPc).

La capacidad de las lectinas para provocar un aumento de la concentración de AMPc en linfocitos es aún discutida. Los resul-

tados contradictorios obtenidos podrían deberse a diferencias en las condiciones de incubación, concentración de mitógenos, métodos de ensayo y clases de poblaciones de linfocitos empleadas en el ensayo. En general se acepta que hay un aumento pequeño, precoz y transitorio en el nivel de AMPc a los 30-40 minutos del estímulo y un segundo pico en etapas más tardías (38,39).

En muchos laboratorios se ha demostrado que una gran variedad de mitógenos (tales como PHA, ConA, PWM, periodato) y el acetato de forbol mirístico (PMA) producen, en linfocitos de diversas especies y tejidos, un aumento de la concentración de GMPc. La PHA aumenta el GMPc en linfocitos, activando las enzimas guanilato ciclasa soluble y de membrana; la activación de estas enzimas requiere calcio (39,40). En términos generales se admite que el AMPc regularía la respuesta inmune, negativamente. En cambio el GMPc actuaría como un regulador positivo de la respuesta inmune. Sin embargo, en última instancia, la regulación positiva o negativa por el aumento de nucleótidos cíclicos depende de la función de las células en las cuales se produzcan los cambios. Por ejemplo el aumento de AMPc en los linfocitos Ts traería aparejado un estímulo y no una reducción en la respuesta efectora, pues reduciría la regulación negativa de las Ts (41).

2.1.3. Activación del transporte de moléculas pequeñas

Los mitógenos estimulan el transporte de glucosa o de sus análogos. Se observa un aumento del transporte de la 3-o- metilglucosa a los 10 minutos de la exposición a la PHA (27).

El transporte de aminoácidos y nucleósidos también se acelera como consecuencia de la estimulación mitogénica, pero en una etapa posterior al transporte de glucosa (32).

2.1.4. Cambios en el flujo de cationes monovalentes

Uno de los eventos más tempranos que se observan durante la activación linfocitaria es el aumento en el influjo del K^+ a través de un sistema Na^+ , K^+ ATP-asa dependiente de Mg^{2+} . Esta enzima es la responsable de la generación y mantenimiento de los gradientes de K^+ (de afuera hacia adentro) y de Na^+ (de adentro hacia afuera) que determinan el potencial de membrana de la célula. Asimismo se ha descrito un aumento de la permeabilidad para el K^+ pocos minutos después del agregado del mitógeno. En consecuencia no se observa un cambio neto en los niveles de K^+ de la célula pues se establece un balance entre el influjo y el eflujo (33).

Se han descrito canales de K^+ en linfocitos T humanos, los cuales estarían íntimamente asociados a acontecimientos tempranos de la activación celular (42).

2.1.5. Flujo de calcio

Los movimientos de calcio intracelulares juegan un papel decisivo en la regulación de los procesos fisiológicos y bioquímicos en la mayoría de las células. Un gran número de hormonas, neurotransmisores y otros comunicadores intercelulares ejercen sus efectos alterando las concentraciones de Ca^{2+} en el citosol y

organelas de sus células blanco.

El Ca^{2+} ingresa a las células esencialmente a través de dos mecanismos. Uno de ellos involucra a los canales de Ca^{2+} , activados por voltaje (regulado por cambios en el potencial de membrana) o por receptor, que actuando como compuertas específicas, permiten el pasaje de estos iones (36). El otro proceso mediante el cual el Ca^{2+} puede entrar a las células es el intercambio con el Na^+ a través de la membrana celular. El eflujo de Ca^{2+} es un proceso de transporte activo que requiere energía e involucra a una ATP-asa Ca^{2+} dependiente.

La mayoría de los agonistas aumentan el Ca^{2+} citosólico, principalmente a través de la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y por la apertura de canales de Ca^{2+} .

El ionóforo de Ca^{2+} A 23187 induce la mitosis de los linfocitos, mediante un incremento del influjo de Ca^{2+} (43).

La movilización de Ca^{2+} intracelular es mediada por el IP3 que es uno de los productos de la hidrólisis de un fosfolípido específico de la membrana plasmática (PIP2). El IP3 se genera muy rápidamente, provocando la liberación de Ca^{2+} en sólo 1 segundo (44).

La capacidad de los mitógenos y antígenos para elevar el Ca^{2+} intracitoplasmático en los linfocitos ha sido comprobado hace largo tiempo (45). Sin embargo, el origen de este aumento no está claro. El Ca^+ podría ser liberado de depósitos no mitocondriales por acción del IP3. Alternativamente, el Ca^{2+} podría ingresar a los linfocitos a través de un canal de calcio

independiente de voltaje como ha sido descrito recientemente (46). La PHA provoca la apertura de este canal al igual que el IP3. Existen evidencias que el IP4 (inositol 1,3,4,5 tetraquisfosfato), que se genera a partir del IP3 por una quinasa plasmática, activaría a los canales de Ca^{2+} (47), y este podría ser un mecanismo adicional para el aumento de Ca^{2+} intracitoplasmático.

El Ca^{2+} extracelular y el Ca^{2+} movilizado de los depósitos intracelulares (mitocondrias, retículo endoplásmico) son indispensables para una serie de procesos inducidos por mitógenos; entre ellos la incorporación de leucina y uridina, el transporte de aminoácidos, la toma de glucosa y la activación de numerosas enzimas, como por ejemplo las fosfolipasas, la guanilato ciclasa, la acil-CoA transferasa, la ATP-asa calcio dependiente y la proteína quinasa-C.

3. BIOLOGIA DE LOS EICOSANOIDES

Las prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs), hidroperóxidos (HPETEs), hidroxiácidos (HETEs) y leucotrienos (LTs), son una gran familia de compuestos estructuralmente relacionados. Son derivados del ácido araquidónico (ácido 5,8,11,14 eicosatetraenoico, AA) y de otros ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos. Genéricamente se los denomina eicosanoides. Son biológicamente muy activos y actúan como mediadores o moduladores de diversas funciones celulares. Se los clasifica como autacoides debido a que se sintetizan localmente y actúan localmente.

3.1. Ácidos grasos precursores de los eicosanoides

Los eicosanoides se forman a partir de los ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos (48) (FIGURA 3) ácido dihomo- γ -linolénico (C20:3 ω 6), ácido araquidónico (C20:4 ω 6) y ácido eicosapentaenoico (C20:5 ω 6). Los ácidos grasos precursores de los eicosanoides están presentes en los fosfolípidos de las membranas celulares de todos los tejidos de los mamíferos y en menor grado en los lípidos neutros, como por ejemplo el triacilglicerol. Las cantidades relativas de estos ácidos grasos en los tejidos dependen de la dieta. El AA y el ácido dihomo- γ -linolénico están presentes en la grasa animal y las carnes rojas, el ácido eicosapentaenoico en el pescado. También estos ácidos

grasos pueden ser obtenidos por desaturación y elongación del ácido graso esencial cis-linoleico (C18:2 ω 6), que se encuentra habitualmente en los vegetales. El AA, que posee cuatro dobles ligaduras, puede ser metabolizado a PGs y Txs de la serie 2 (Ej: PGE₂ y TxA₂) y/o a leucotrienos que contienen 4 dobles ligaduras (LTA₄) (48,49,50,51). Los correspondientes metabolitos derivados del ácido dihomo- δ -linolénico son PGE₁, TxA₁ y LTA₃ y aquellos derivados del ácido eicosapentaenoico son PGE₃, TxA₃ y LTA₅.

El precursor más abundante de los eicosanoides en el hombre es el AA (52), por lo tanto su metabolismo es considerado con mayor detalle, lo cual no descarta la importancia biológica de los otros precursores ni la de sus productos de las series 1 y 3.

3.2. Movilización del ácido araquidónico

El control del AA libre es un factor importante en la regulación de la síntesis de eicosanoides, ya que sólo liberado de sus sitios de depósito estaría disponible para metabolizarse y transformarse en otros productos. El paso limitante para la producción de metabolitos del AA, es la disponibilidad del mismo como ácido graso libre (53), ya que éste se combina muy rápidamente con la fracción fosfolipídica de las membranas celulares. Generalmente la cantidad de AA libre en el citoplasma y en el plasma es muy baja. En consecuencia, la producción basal de eicosanoides en células sin estimular es baja. El AA necesario para la síntesis basal de eicosanoides se origina principalmente

del pool metabólico (depósitos grasos y dieta). Cuando diversos estímulos afectan la integridad de la bicapa lipídica de las membranas celulares el AA es liberado principalmente de los fosfolípidos de las membranas celulares; principalmente de la fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) (54). Una menor cantidad de AA se encuentra en el fosfatidilinositol (PI) y en la fosfatidilserina (PS). La liberación del AA de los fosfolípidos ha sido ampliamente estudiada y ha dado lugar al descubrimiento de un gran número de fosfolipasas (55) (FIGURA 4). El AA está casi exclusivamente esterificado en la posición 2 de los fosfolípidos y es liberado por activación de una acilhidrolasa: la fosfolipasa A₂ (PLA₂) (56) (FIGURA 5, paso 8). La PLA₂ puede ser estimulada por el ácido fosfatídico (AP) y lisofosfatídico (ALP), que son dos productos derivados de la acción de la fosfolipasa C (PLC) (57). Las plaquetas contienen otra PLA₂ que es específica para AP (58), (FIGURA 5, paso 7). La mayor parte del PI es hidrolizado por una PLC específica de PI (56) (FIGURA 5, paso 1), y en combinación con una 1,2-diacilglicerol (DAG) quinasa convierte al DAG en AP (59), (FIGURA 5, paso 2). El AA también se libera directamente del DAG por acción de una DAG lipasa (Figura 5, paso 5). En las plaquetas el PI puede resintetizarse a partir del AP (60) (FIGURA 5, pasos 3 y 4).

El AA libre puede ser reincorporado al pool fosfolipídico por acción de una acil-transferasa, puede unirse a la albúmina plasmática o puede servir como sustrato de por lo menos dos sistemas enzimáticos distintos: el sistema de ciclooxigenasas

(CO) y el de lipoxigenasas (LO).

3.2.1. Inhibición de la liberación del ácido araquidónico

Las fosfolipasas pueden ser activadas por estímulos de carácter químico (histamina, trombina), hormonal (bradiquinina, angiotensina II, epinefrina) y mecánico.

Tanto la PLC como la PLA₂ son enzimas Ca²⁺ dependientes. En consecuencia, aquellas sustancias que son quelantes del Ca²⁺ como EDTA y EGTA (61), y el AMP cíclico que también disminuye el nivel de Ca²⁺ intracelular, son inhibidores de la liberación del AA. Mientras que ionóforos de Ca²⁺, como el A 23187 y la Ionomicina estimulan la liberación del AA y la síntesis de eicosanoides en diversos tejidos.

Se supone que el efecto de diversos inhibidores de la agregación plaquetaria, tales como el bromuro de p-bromofenacilo, propranolol, indometacina en altas concentraciones (10⁻⁴M) y diversos agentes antimaláricos: quinina, quinacrina, mepacrina y cloroquina, sería el resultado de una actividad anti-PLA₂ (52). Sin embargo, se ha demostrado que algunas de estas sustancias son altamente inespecíficas. Muchos compuestos que inhiben a la PLA₂, también lo hacen con la PLC (55).

Los glucocorticoides inducen la síntesis de un péptido inhibidor de la PLA₂, llamado lipocortina o lipomodulina (62). El 2-nitro carboxifenil, NN-difenil carbamato (NCDC), un compuesto que originalmente se empleó como inhibidor de serin-

esterasas, también puede actuar como un inhibidor de la PLC (63).

3.3. Metabolismo del ácido araquidónico

El AA puede metabolizarse por 3 vías enzimáticas distintas (FIGURA 6). Los productos finales dependerán de las enzimas disponibles en los diferentes tejidos.

3.3.1. Vía de la ciclooxigenasa

El AA libre puede servir como sustrato del sistema enzimático conocido como sistema de la ciclooxigenasa (CO). Este complejo enzimático está presente en la fracción microsomal de diversos tipos celulares. Posee actividad oxigenasa y peroxidasa, dando lugar a un par de intermediarios inestables: PGG₂ y PGH₂ (49). El endoperoxido PGH₂ puede ser metabolizado por la prostaciclina sintetasa a prostaciclina (PGI₂) (64); por la tromboxano sintetasa a tromboxano A₂ (TxA₂) (50); por isomerasas a prostaglandina (PG)E₂ y PGD₂ (compuestos con un anillo ciclopentano) y por una reductasa o no enzimáticamente a PGF₂α (51). El PGH₂ también puede convertirse en un derivado no prostaglandínico: un hidroxiaácido de 17 C (12-OH-5,8,10-heptadecatrienoico, HHT, que posee propiedades quimiotácticas) y malondialdehído (MDA, que es una sustancia tóxica) (65).

La PGI₂ se forma principalmente en el endotelio de la pared

vascular (64) y el TxA_2 , predominantemente en las plaquetas (65). La PGI_2 es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria al igual que la PGD_2 . El TxA_2 es un poderoso vasoconstrictor y agregante plaquetario. En consecuencia los efectos biológicos de la PGI_2 y del TxA_2 son opuestos. El TxA_2 es muy inestable y es rápidamente degradado a TxB_2 (66). La PGI_2 también es inactivada por degradación convirtiéndose en el producto estable 6-ceto $\text{PGF}_1\alpha$ (64).

Las PG de las series E, F y D poseen efectos biológicos sobre los sistemas: cardiovascular, respiratorio, renal, reproductivo, nervioso y gastrointestinal. Los efectos biológicos sobre el sistema inmune, serán descritos posteriormente.

Las PGs pueden ser detectadas y analizadas por diversos métodos: bioensayo, cromatografía gaseosa, cromatografía líquida de alta presión, radioinmunoanálisis y espectrometría de masa.

3.3.2. Vía de las lipoxigenasas

Las lipoxigenasas (LO), que son enzimas citoplasmáticas, producen a partir del AA, monohidroperóxidos (HPETEs) y por sucesivas oxigenaciones, sus correspondientes mono, di y trihidroxiácidos (HETEs, di HETEs y tri HETEs).

Según cual sea el carbono de la molécula sobre el que actúan, se las denomina : 5-LO, 12-LO o 15-LO. La 12-LO fue inicialmente descrita en plaquetas, la 5-LO se detecta predominantemente en leucocitos y mastocitos y la 15-LO también se

encuentra en leucocitos, células epiteliales y otros tipos celulares (67,68).

En leucocitos estimulados, el AA es metabolizado por la vía de la 5-LO al ácido 5 hidroperoxieicosatetraenoico (5 HPETE) que luego puede convertirse en ácido 5 hidroxieicosatetraenoico (5 HETE) o dar lugar a la formación de productos biológicos muy activos denominados leucotrienos. El nombre de estos compuestos deriva de: leuco, por haber sido detectados primeramente en leucocitos polimorfonucleares; trienos, por poseer en su estructura tres dobles ligaduras conjugadas (aunque la totalidad de la molécula tiene, cuando proviene del AA, un total de 4 dobles ligaduras que se señala empleando el subfijo 4 agregado a la letra de su denominación alfabética) (69). Recientemente se ha descrito la formación de leucotrienos en plaquetas humanas (70).

El leucotrieno A₄ (LTA₄) es un epóxido muy inestable que puede ser convertido por una epóxido hidrolasa a LTB₄, que es un dihidróxiácido. También puede ser conjugado con glutatión a LTC₄, a través de una glutatión transferasa. El LTC₄ es convertido a LTD₄ y E₄ por sucesiva eliminación de dos aminoácidos de la porción glutatión del LTC₄. Por transpeptidización del LTE₄, se forma el LTF₄.

El LTB₄ es generado por células de diversas clases entre ellas, leucocitos polimorfonucleares, eosinófilos y macrófagos peritoneales. Posee propiedades quimiotácticas, quimiocinéticas y agregantes. También puede comportarse como ionóforo de calcio (71).

Cuando diversos tejidos; particularmente el músculo liso del intestino, el útero, el pulmón, los vasos sanguíneos y el corazón son expuestos a antígenos apropiados, se libera una sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRS-A) que está constituida por una mezcla variable de LTC₄, LTD₄ y LTE₄. (72).

Los leucotrienos ejercen potentes acciones sobre diversos órganos y sistemas, incluyendo los sistemas cardiovascular (corazón, vasos sanguíneos, microcirculación), pulmonar (pulmón, vías respiratorias), nervioso central, gastrointestinal e inmune. Poseen propiedades broncoconstrictoras, aumentan la permeabilidad vascular, producen vasoconstricción. Los efectos de los LTs sobre los distintos órganos se ejercen a través de receptores específicos (73,74).

Recientemente se ha descrito una nueva serie de compuestos oxigenados del AA, denominados "lipoxinas", resultantes de la acción de la 5-L0 y de la 15-L0. Son trihidroxi-derivados que poseen 4 dobles ligaduras conjugadas; lipoxina A:(ácido 5,6,15L trihidroxi-7,9,11,13 eicosatetraenoico), lipoxina B:(ácido 5D,14,15 trihidroxi-6,8,10,12 eicosatetraenoico (75).

3.3.3. Vía de la epoxigenasa

Recientemente se ha demostrado que el AA puede ser oxidado por una serie de monooxigenasas dependientes del citocromo P-450. Esta vía es también denominada de la epoxigenasa ya que da lugar a una nueva serie de epóxidos que pueden ser hidrolizados a sus

correspondientes dioles. Las enzimas dependientes del citocromo P-450 se localizan preferentemente en las células de los vasos sanguíneos (76). Como muchos de los efectos biológicos de los derivados oxidativos del AA se ejercen a nivel de vasos y células sanguíneas, esta nueva vía tiene gran interés por su posible papel fisiopatogénico. Algunos ácidos epoxieicosatrienoicos inhiben la actividad de la ciclooxigenasa y la agregación plaquetaria (77).

3.4. Inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico

Existen numerosos compuestos cuyo efecto es impedir la acción de las enzimas que intervienen en el metabolismo del AA. A continuación se describirán los inhibidores utilizados más frecuentemente.

3.4.1. Inhibición de la ciclooxigenasa

La aspirina o ácido acetil-salicílico (ASA) inhibe la conversión del AA a los endoperóxidos cíclicos, ya que acetila irreversiblemente el sitio activo de la ciclooxigenasa (78). La inhibición de la síntesis de PGs por drogas antiinflamatorias ha sido demostrada en una variedad de células y tejidos; entre los más comunmente empleados se destacan: la indometacina y la fenilbutazona (79). Algunos de estos inhibidores ejercen además otros efectos colaterales; la aspirina y el salicilato de sodio en concentraciones terapéuticas, inhiben la actividad de la PLC y la indometacina (10^{-6} M) inhibe a la proteína quinasa dependiente de

AMPC y en concentraciones más elevadas inhibe a la fosfodiesterasa (80).

3.4.2. Inhibición de la prostaciclina-sintetasa

Se ha demostrado que algunos hidroperoxiácidos (15-HPETE) inhiben a la PGI₂ sintetasa selectivamente (81). La tranicilpromina que es un inhibidor de la monoaminoxidasa también inhibe selectivamente la síntesis de PGI₂ (82).

3.4.3. Inhibición de la tromboxano-sintetasa

Numerosos compuestos han sido propuestos como inhibidores selectivos de la síntesis de TXs; entre ellos el imidazol y algunos de sus análogos; el nictindol(L-8027) así como varios análogos de endoperóxidos prostaglandínicos (83,84).

3.4.4. Inhibidores de la lipoxigenasa

Un análogo sintético del AA que también es capaz de inhibir a la CO, inhibe a la LO por competición con el sustrato. Se trata del ácido 5,8,11,14 eicosatetraínoico (ETYA), que presenta 4 triples ligaduras en lugar de las 4 dobles ligaduras del AA. Según algunos autores, inhibe el pasaje de 5-HPETE a LTA₄ (85).

Otros compuestos no relacionados estructuralmente con el AA, como ser el ácido nordihidroguayarático (NDGA), fenidona y baicalina inhiben la lipoxigenación. Su mecanismo de acción podría estar relacionado a sus propiedades reductoras y antioxidantes (86). El 15-HETE es un poderoso y específico inhibidor de la 12-

L0 en las plaquetas (69) y de la 5-L0 en leucocitos polimorfonucleares y en linfocitos T humanos (87).

3.4.5. Antagonistas de la acción de la SRS-A

Un camino alternativo para interferir con la vía de la L0 y sus productos es la de bloquear, por antagonistas, los efectos de los LTs a nivel de sus receptores. Se desarrollaron varios antagonistas específicos de la SRS-A entre los que se destaca el compuesto sintético FPL-55712 (88).

FIGURA 3

Formación y estructura de los ácidos grasos precursores de eicosanoides

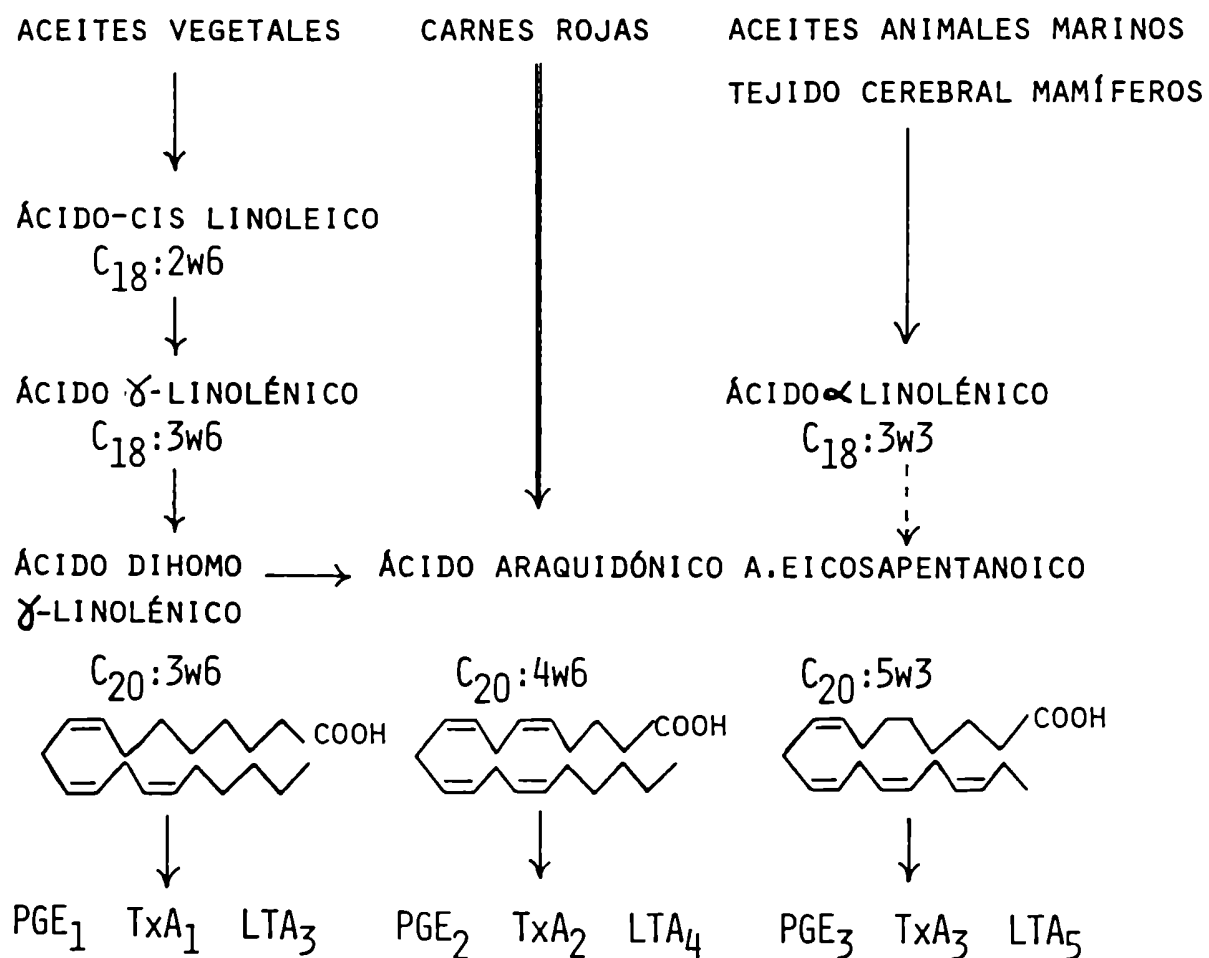
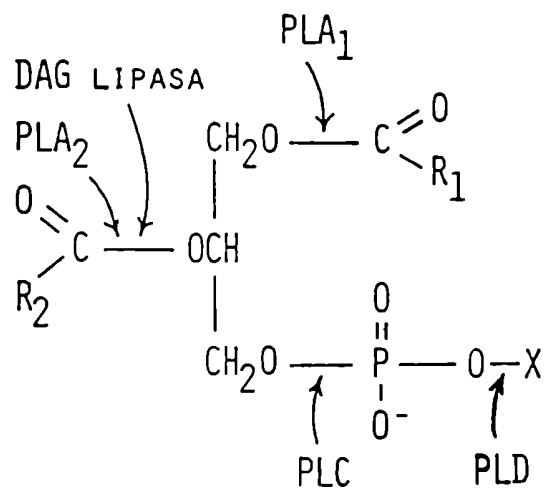


FIGURA 4

Sitios de acción de las fosfolipasas

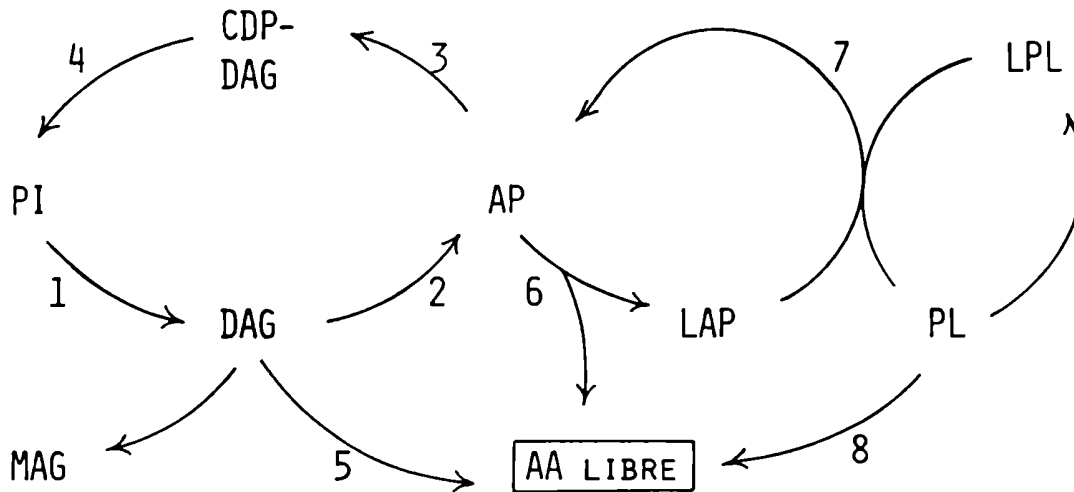


PLA₁, PLA₂, PLC Y PLD : FOSFOLIPASAS A₁, A₂, C Y D

DAG LIPASA: 1,2 DIACILGLICEROL LIPASA, ACTÚA EN EL MISMO LUGAR QUE LA PLA₂ PERO SÓLO LUEGO DE LA ACCIÓN DE LA PLC

FIGURA 5

Movilización del ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos



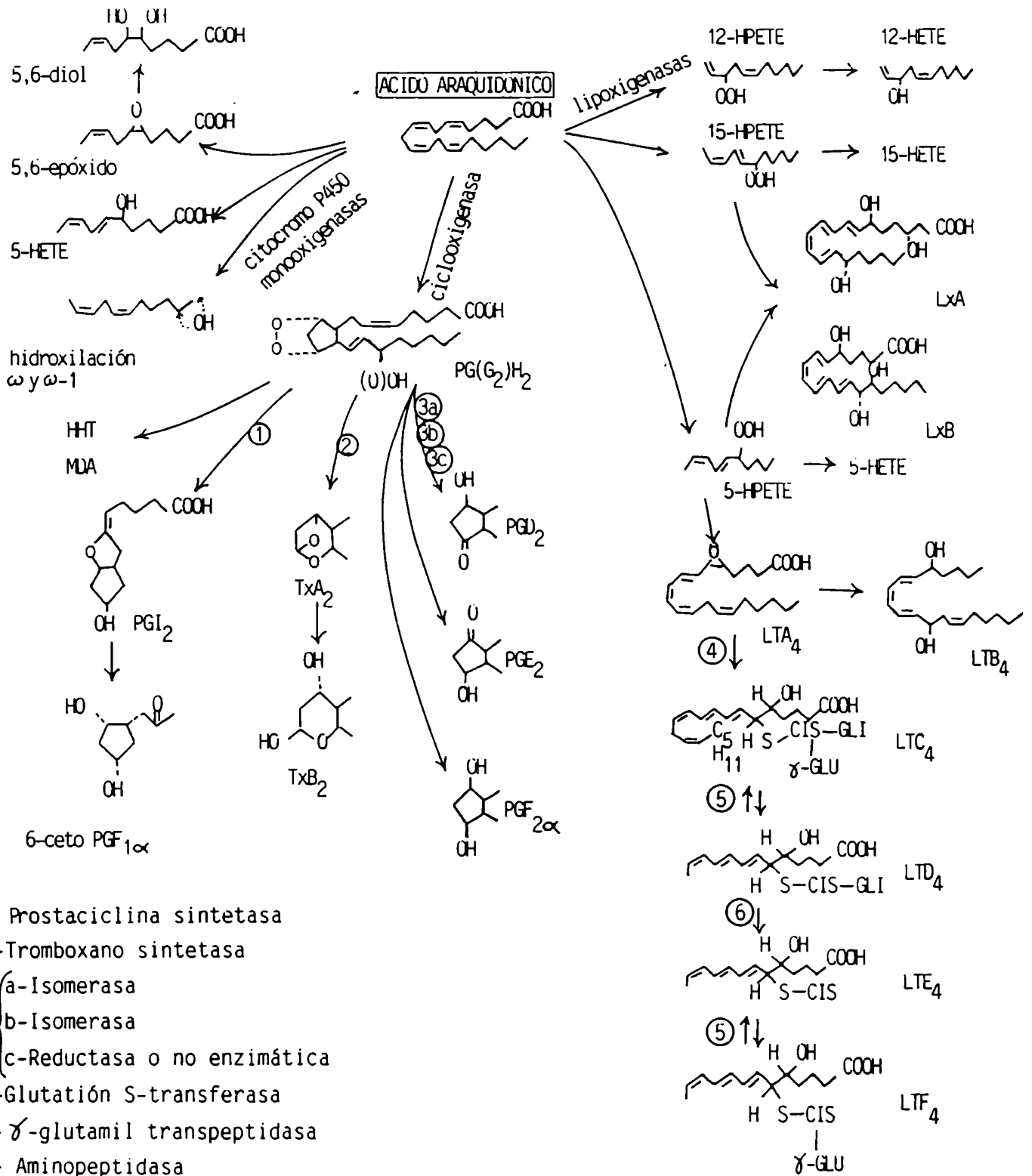
ENZIMAS

- 1- FOSFOLIPASA C ESPECÍFICA DE FOSFATIDIL-INOSITOL
- 2- 1,2 DIACIL GLICEROL QUINASA
- 3- CTP-FOSFOINOSITOL CITIDIL TRANSFERASA
- 4- CDP-1,2 DIACILGLICEROL FOSFATIDIL INOSITOL TRANSFERASA
- 5- 1,2 DIACILGLICEROL LIPASA
- 6- FOSFOLIPASA A_2 ESPECIFICA DE ACIDO FOSFATIDICO
- 7- ACILTRANSFERASA
- 8- FOSFOLIPASA A_2

- PI: FOSFATIDIL-INOSITOL
- DAG: 1,2 DIACILGLICEROL
- MAG: MONOACILGLICEROL
- AP: ÁCIDO FOSFATÍDICO
- CDP-DAG: CITIDIL DIFOSFATO-DIACIL GLICÉRIDO
- LAP: ÁCIDO LISO FOSFATÍDICO
- PL: FOSFOLÍPIDO
- LPL: LISOFOSFOLÍPIDO

FIGURA 6

METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO



3.5. Regulación de la respuesta inmune por metabolitos del ácido araquidónico

Los productos derivados del metabolismo del AA ejercen diversos efectos sobre las distintas poblaciones celulares dentro del sistema inmune. Estas células metabolizan al AA por la vía de la ciclooxigenasa a PGs, Tx_s y PGI₂. Se ha demostrado que los leucocitos polimorfonucleares producen PGD₂, PGE₂, PGI₂ y TxA₂. Los monocitos de sangre periférica producen solo PGE₂ y TxB₂ y los mastocitos PGD₂ (89). Estos productos varían considerablemente en cuanto al tipo celular que los origina y al método utilizado para inducir su liberación de las células. Los linfocitos no parecen sintetizar PGs (90).

La PGE₂ es el producto más activo derivado principalmente de macrófagos y monocitos estimulados (91,92). Uno de los mayores efectos de las PGs de las series E e I (PGE₂ y PGI₂) es la de estimular la adenilato ciclasa aumentando los niveles intracelulares de AMPc (93).

Las primeras evidencias de la generación de PGs por células del sistema inmune surgieron de un estudio efectuado en células de bazo murino estimuladas con mitógenos o con antígenos específicos. Se detectaron altas concentraciones de PGs en los sobrenadantes de los cultivos de estas células (94).

Parker y sus colaboradores estudiaron sus efectos en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana y comprobaron que varias PGs inhibían la proliferación linfocitaria inducida por

PHA (95). Otros grupos de investigadores demostraron que concentraciones micromolares de PGE₂ (10⁻⁶M, 10⁻⁷M) inhibían una variedad de funciones linfocitarias: citotoxicidad mediada por linfocitos T, citotoxicidad NK, secreción de linfoquinas y formación de células capaces de producir placas de hemólisis (96). También se inhibía la quimiotaxis y agregación de leucocitos y su metabolismo oxidativo (66). Estos estudios proponen que la producción local de ácidos grasos del tipo de las PGs estaría involucrada en la modulación de la respuesta inmune. La PGE₂ inhibe también la formación de colonias de macrófagos y de células T de médula ósea. Además induce la diferenciación de timocitos y linfocitos B inmaduros y otros precursores de células hematopoyéticas a células maduras, a través de la elevación del AMPc intracelular (66).

Muchos de los estudios realizados hasta el momento se efectuaron en presencia de antiinflamatorios no esteroides, como la indometacina y el ácido acetil salicílico, que bloquean la ciclooxigenasa alterando notablemente las respuestas de las células inmunocompetentes. La especificidad y las bajas concentraciones requeridas para producir los efectos moduladores descritos sugiere la presencia de receptores específicos en las células (97). La respuesta a las PGs difiere entre las distintas poblaciones celulares y en ciertos estadios patológicos y no se sabe aún si esta variación de la respuesta es el resultado de una alteración en la densidad de receptores.

La estimulación in vitro de células sanguíneas periféricas

conduce a la proliferación de células T y a la síntesis de PGs por los monocitos (98). La PGE₂ es a su vez capaz de inhibir la proliferación T (99), a través de la activación de una población CD8+ que inhibe la producción de IL-2 por células T activadas (100). En consecuencia la estimulación de células inmunocompetentes induce un mecanismo de control negativo capaz de regular la respuesta. La indometacina que es un inhibidor de la ciclooxigenasa aumenta la producción de IL-2 por linfocitos humanos (101,102,103).

La secreción de IL-1 por macrófagos activados está inhibida por la producción endógena de PGE₂ a través del aumento de AMPc; esto contribuiría también a la inmunosupresión (104).

La PGE₂ podría suprimir directamente la proliferación y diferenciación de células B en respuesta a ciertos antígenos, pero no inhibiría la generación de factores de crecimiento de las células B derivados de las células T (105, 106).

Los efectos de la PGE₂ sobre la actividad citolítica de las células NK son supresores (107); aunque estas células una vez activadas con IFN γ o IL-2 son refractarias a los efectos inhibitorios de la PGE₂ (108).

En la actualidad existen evidencias de la contribución de las PGs a la respuesta inflamatoria, mientras que el rol del TxA₂ en la inflamación permanece aún indefinido.

El TxA₂ es muy lábil, su vida media es de 30 segundos, pasando luego a TxB₂, siendo éste último el metabolito que se cuantifica en los radioinmunoensayos. En consecuencia la mayoría

de los estudios se han realizado en presencia de inhibidores de la Tx sintetasa.

Algunos de estos resultados sugieren que el TxA_2 estimularia la proliferación linfoide en respuesta a mitógenos (109) mientras que otros lo niegan (110,111). El TxA_2 tambien podria estar involucrado en la actividad citotóxica natural (112).

La PGI_2 , en bajas concentraciones inhibe la quimiotaxis y la adherencia de leucocitos a fibras de nylon o a células endoteliales (113).

Las células del sistema inmune también metabolizan al AA por la vía de las LOs (114). Los mediadores derivados de la 5-LO (LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , 5-HETE) son producidos por células que incluyen a monocitos, neutrófilos, eosinófilos y mastocitos y por órganos como el pulmón, ganglios linfáticos, bazo, piel. Una variedad de estímulos inmunológicos pueden dar lugar a la formación de productos de LOs, entre estos se incluyen, inmunoglobulinas agregadas, anticuerpos anti-receptor, inmunocomplejos. Los estímulos no inmunológicos incluyen al A 23187, formil metionil péptidos, veneno de cobra, zymosan activado, componentes purificados del complemento y lectinas. El estímulo más poderoso es el ionóforo A 23187, pero siempre en presencia de Ca^{2+} extracelular. El 5-HETE es cuantitativamente el principal producto obtenido a partir de leucocitos y mastocitos (115,116). Es un importante mediador en la inflamación. Posee actividad quimiocinética, induce la liberación de enzimas lisosomales de neutrófilos y aumenta la liberación de histamina inducida por antígenos en

mastocitos y basófilos. El 5-HPETE también es activo. Los hidroperóxidos de ácidos grasos estimularían la guanilato ciclasa aumentando la concentración intracelular de GMP cíclico (GMPc) (117).

El LTB₄ es un mediador de la activación leucocitaria. En muy bajas concentraciones estimula el movimiento celular en neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos (118). En altas concentraciones estimula la quimiotaxis en neutrófilos y probablemente en otros tipos celulares. También promueve la liberación de enzimas lisosomales (114). Es el más potente agente agregante y quimiotáctico conocido (119). Esto sugiere que la acción del LTB₄ sobre las células es a través de receptores específicos (120). El receptor de alta afinidad es activo en el rango de concentraciones en el cual el LTB₄ produce agregación. Las respuestas quimiotácticas tienen lugar a altas concentraciones de LTB₄ e involucrarían al receptor de baja afinidad (114).

El agregado de dosis de LTB₄, extremadamente bajas, (10^{-12} M- 10^{-14} M) a cultivos de células mononucleares periféricas estimuladas con PHA o con Con A inhibe la respuesta linfoproliferativa (121). El LTB₄ actúa sobre ambas subpoblaciones de linfocitos, CD4⁺ y CD8⁺, pero sus consecuencias funcionales son opuestas. Inhibe la proliferación de las células CD4⁺ mientras que estimula la proliferación de células CD8⁺ (122,123). También, en muy bajas concentraciones inhibe la producción policlonal de IgG e IgM en linfocitos periféricos humanos estimulados con PWM (124).

Los leucotrienos y monohidroxiácidos afectan la secreción de linfoquinas y monoquinas, particularmente IL-1, IL-2 e IFN- γ , y en contraste con la PGE₂, generalmente actúan estimulando la secreción (125,126). El LTB₄ puede suplir los efectos de la IL-2 para la producción de IFN- γ y potenciarlos, pero no puede reemplazar a la IL-2 como estímulo de proliferación (127). No obstante, puede cooperar con cantidades subóptimas de IL-2 llevando la proliferación a niveles óptimos (128). También estimula a los monocitos para la producción de IL-1 y además su actividad es requerida para la inducción de IL-2 por la IL-1 (114).

Los receptores de LTB₄ están presentes en ambas subpoblaciones CD4 y CD8 (122). La vitamina D₃ induce receptores de LTB₄ en la línea granulocítica humana HL-60 (129).

Los productos de la 5-LO actúan como moduladores de las funciones NK y citotóxica natural (130,131). Varios autores han demostrado que la inhibición de la fosfolipasa A₂ y la actividad de la lipoxigenasa suprimían la citotoxicidad natural y NK (132,133). Asimismo se describió que el LTB₄ aumenta la actividad citotóxica natural y NK debido a un incremento de uniones célula efectora-célula blanco y de la eficiencia lítica (134).

Los leucotrienos C₄, D₄ y E₄ que constituyen la SRS-A son producidos por monocitos sanguíneos, alveolares y peritoneales, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. La SRS-A afecta la quimiotaxis y la liberación de enzimas lisosomales, pero aparentemente es menos potente que el LTB₄ (114).

Los LTC₄ y LTE₄ pueden reemplazar a la IL-2 o a la población

T colaboradora para la producción de IFN- γ , en cultivos de células de bazo de ratón (135). Se ha demostrado que concentraciones 10^{-12} M de LTD₄ y LTE₄ inhiben la transformación mitogénica inducida por PHA de linfocitos de bazo de ratón y que las de 10^{-7} M impiden la aparición de células formadoras de anticuerpos (136).

El 15-HETE, producido por la acción de la 15-LO, inhibe la producción de 5-HETE y de LTB₄, a partir de linfocitos T humanos estimulados con A 23187 (137). Asimismo ejerce un efecto inhibitorio de la proliferación, inducida por PHA, de los linfocitos T, sin embargo no modifica la respuesta mitogénica al LPS de linfocitos B (138). El 15 HPETE induce células supresoras en un sistema de producción de anticuerpos e inhibe la proliferación celular (114).

Las lipoxinas A y B tienen efectos sobre la generación de metabolitos activos del oxígeno, degranulación de neutrófilos y actividad NK (139). La lipoxina A posee una acción estimulatoria sobre la Proteína Quinasa C (140). Se sabe poco sobre su acción sobre otras funciones del sistema inmune.

4. LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

La leucemia linfática crónica (LLC) ha sido definida tradicionalmente como una anomalía proliferativa que se caracteriza por una acumulación progresiva de pequeños linfocitos en sangre, médula ósea, ganglios linfáticos y otros órganos. Es una enfermedad característica de individuos adultos y es más frecuente en hombres que en mujeres. El consenso en el momento actual es que la LLC es una proliferación monoclonal maligna de linfocitos B (LLC-B) con un bloqueo en la maduración celular (141). Sólo un pequeño porcentaje de casos (< 5%) involucra a los linfocitos T.

La utilización de anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos de membrana y las técnicas de biología molecular que estudian el reordenamiento de genes de inmunoglobulinas, han permitido revelar que las células de pacientes con LLC-B difieren en muchos aspectos de los linfocitos B normales circulantes.

Con el objeto de relacionar las características de la célula maligna con los estadios de diferenciación del linfocito B normal, se efectuará una breve reseña del desarrollo ontogénico de la célula B .

4.1. Ontogenia del linfocito B normal

Los estadios de diferenciación del linfocito B pueden ser divididos en dos fases principales: una fase independiente del antígeno (célula B progenitora a linfocito pre-B) y otra fase dependiente del estímulo antigénico (de linfocito B maduro a célula plasmática secretora de anticuerpos) (142).

En los mamíferos la diferenciación y maduración B comienza en el hígado fetal y en la médula ósea y continúa en los órganos linfoides periféricos.

La diferenciación B (FIGURA 7) comienza con el reordenamiento de los genes de inmunoglobulina (Ig) de la célula progenitora. La primera célula identificable es la precursora B (pre-B) que se caracteriza por la expresión de Ig citoplasmática (cadena μ). En esta etapa no se detecta la expresión de cadenas livianas. Durante este estadio se expresa el Ag CD10 y los siguientes antígenos, que permanecen en la membrana del linfocito B durante todo el periodo de diferenciación: HLA-DR (antígeno de Histocompatibilidad de Clase II), CD19, CD20, CD22 y CD24 (143,144). Las moléculas CD37, CD39 y CDw40 también son antígenos de diferenciación B (144). Una vez que la cadena liviana de Ig es sintetizada y en consecuencia se expresa en la membrana la molécula entera de IgM, la célula (linfocito B inmaduro) es capaz de reconocer al antígeno ya sea directamente o mediante la colaboración de macrófagos y células T. Esta célula prosigue su desarrollo y en un estadio más tardío de maduración expresa

simultáneamente IgM e IgD en su superficie. En esta etapa también se expresan receptores para eritrocitos de ratón (RER), que son marcadores característicos de las células B inmaduras (145); receptores para el fragmento Fc de la IgG y para los componentes C3b y C3d del complemento (142). Al receptor para el componente C3d, que actualmente se lo denomina CD21, también posee un sitio de unión específico para el virus de Epstein-Barr (EBV).

Durante la etapa de activación el linfocito sufre un reordenamiento molecular que conduce a un cambio de clase de inmunoglobulina. La célula expresa IgM, IgD, IgG, IgA o IgE en su superficie (linfocito B maduro). Además durante este período, el linfocito B adquiere diversos antígenos de membrana; algunos son comunes a células activadas de otras estirpes como el receptor para la IL-2 y el receptor para la transferrina (T9) y otros están relacionados a la serie B como el CD23.

Los antígenos y otros ligandos multivalentes inducen al linfocito B maduro a proliferar (linfocito B de memoria) o a diferenciarse a célula plasmática. En la etapa final de diferenciación los marcadores característicos de la serie B desaparecen y el plasmocito adquiere nuevos antígenos tales como el PCA-1, PC-1 y el CD38 (143).

4.2. Fenotipo celular de la LLC-B

La mayoría de los linfocitos de la LLC-B expresan Ig de

superficie de clase M y de un solo tipo de cadena liviana (κ o λ), demostrando así la naturaleza monoclonal de esta patología linfoproliferativa (FIGURA 7). Ocasionalmente co-expresan IgM e IgD. La intensidad de la IgM de superficie expresada en las células de la LLC-B es muy baja comparada con la del linfocito B normal.

Las células de la LLC-B expresan además los antígenos HLA-DR, CD19, CD20, CD21, CD23 y CD24 y el antígeno CD5 que es un marcador de células T maduras (144,146). Muy pocas células de la LLC-B presentan receptores para el componente C3b del complemento. El 95% de los linfocitos de la LLC-B poseen receptores para eritrocitos de ratón (RER), en consecuencia este marcador resulta útil para el diagnóstico de esta enfermedad. Sólo una pequeña subpoblación de linfocitos B normales presenta a este receptor en su superficie. En la células de la LLC-B no se expresa la deoxinucleotidil transferasa terminal (DTT), que es un marcador que está presente en los primeros estadios de la diferenciación B (147).

4.3. Propiedades funcionales de las células de la LLC-B

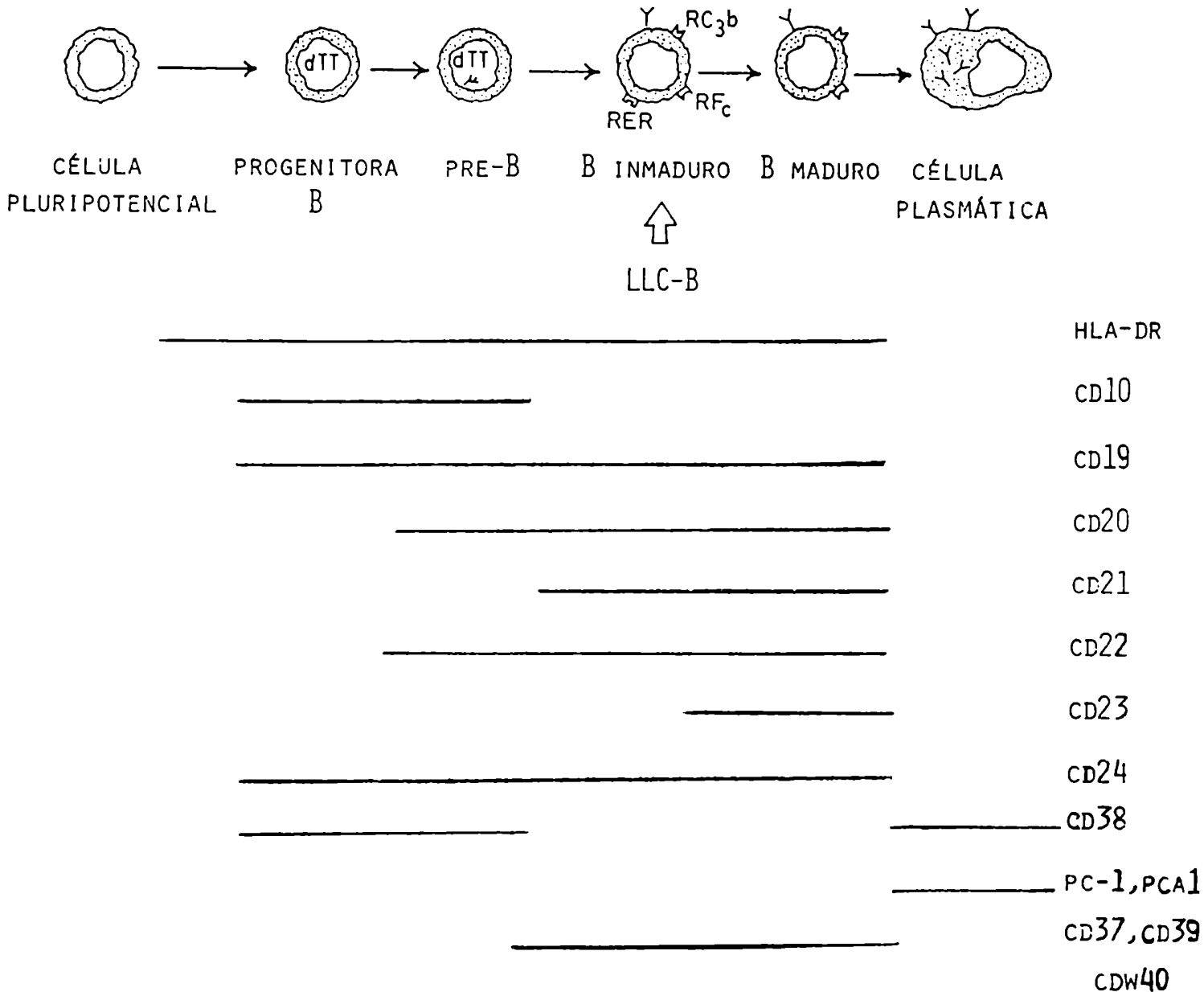
Se ha demostrado que las células leucémicas no responden en cultivos mixtos autólogos y alogeneicos. La respuesta *in vitro* a mitógenos B como el PWM y el LPS y a factores de crecimiento como el BCGF esta disminuida (147). Esto último, conjuntamente con los bajos niveles de Ig de superficie que se han encontrado en

estas células y la ausencia del "capping" de las moléculas de Ig, sugieren anomalías en la fluidez de la membrana plasmática. Por último, cabe señalar que se han encontrado alteraciones en el transporte de aminoácidos.

A pesar de que el o los mecanismos responsables del arresto madurativo de las células de la LLC-B, permanecen desconocidos, se han reportado intentos de superarlo, *in vitro*, usando diferentes agentes. Entre éstos, el éster de forbol, 13 acetato de 12-o-tetradecanoil-forbol (TPA), ha probado ser particularmente efectivo en inducir características o bien plasmocitoides o semejantes a células vellosas en células de LLC-B (148, 149).

FIGURA 7

Ontogenia del linfocito B



μ = CADENA PESADA μ INTRACITOPLASMÁTICA

Y = INMUNOGLOBULINA

HLA-DR = ANTIGENO DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE II

RC_{3B} = RECEPTOR DE LA FRACCIÓN C_{3B} DEL COMPLEMENTO

RF_c = RECEPTOR DEL FRAGMENTO Fc DE LA IgG

RER = RECEPTOR DEL ERITROCITO DE RATON

dTT = DEOXINUCLEOTIDIL TRANSFERASA TERMINAL

CD = CLUSTER DE DIFERENCIACION

PC-1, PCA₁ = AGS. DE DIFERENCIACION DE CELULAS PLASMATICAS

5. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS ESPECIFICOS

En general, el estudio de las células que integran los circuitos inmunes y el de sus funciones ha sido enfocado hacia el análisis de la interacción celular específica y sus consecuencias dentro del propio sistema. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los linfocitos activados, pueden actuar como reguladores del comportamiento fisiológico de otras células y tejidos no relacionados al sistema inmune. Actualmente existen evidencias que los linfocitos activados producen factores solubles que estimulan la angiogénesis (150) y regulan la actividad de los osteoclastos (151). También se ha comprobado que productos derivados de linfocitos y macrófagos, regulan diversas funciones de las células del endotelio vascular, tales como proliferación, migración, producción de factores estimuladores de colonias y expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase II (152,153). Asimismo, se ha encontrado que productos derivados de neutrófilos y células mononucleares estimuladas pueden iniciar o potenciar la producción de PGI_2 por las células endoteliales (154). Una serie de sustancias derivadas de leucocitos como el interferón- α , elastasa e IL-1, tienen la capacidad de aumentar la síntesis de PGI_2 por las células endoteliales (153,155). La IL-2 también posee un efecto estimulatorio sobre la síntesis de

PGI₂, por las células del endotelio de la aorta bovina, probablemente a través de un aumento en la síntesis de novo o actividad de la ciclooxigenasa (156). También se ha demostrado que linfocitos de sangre periférica humana estimulados con AA son capaces de inducir la agregación plaquetaria (157).

Asimismo, durante la década pasada ha quedado claramente establecida la existencia de una interacción regulatoria entre el sistema neuroendócrino y el sistema inmune. Se ha observado que la respuesta inmune modifica o mimetiza respuestas endócrinas, autonómicas y centrales (158) a través de sustancias solubles. Del mismo modo, la respuesta inmune está también sujeta al control neuroendócrino (159,160). Las células del sistema inmune también poseen la capacidad de producir sustancias propias del sistema neuroendócrino, tales como encefalinas, endorfinas, corticotrofina y tirotrofina (161,162,163,164).

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que los linfocitos humanos normales estimulados con PHA reaccionan con el tejido cardíaco produciendo un aumento de la tensión y la frecuencia de las contracciones (165); el mismo efecto se produce con el agregado de los sobrenadantes de los linfocitos estimulados al tejido auricular (166). La actividad estimulatoria observada se debería en parte a la acción de la IL-2 (167).

Con el objeto de estudiar los requerimientos para la interacción de células linfoides con el tejido cardíaco, se utiliza en el presente trabajo, una preparación de aurícula aislada de rata latiendo espontáneamente y linfocitos humanos normales o de

pacientes con enfermedades linfoproliferativas. Este modelo experimental sirve como ensayo biológico para detectar la presencia de productos activos liberados por las células linfoides capaces de alterar la respuesta inotrópica y cronotrópica del tejido cardíaco.

Los objetivos específicos de este trabajo de tesis son:

1. Determinar que clase de células son responsables de la estimulación de la contractilidad cardíaca y que pasos en la activación linfocitaria están involucrados en la misma.
2. Estudiar la acción de linfocitos humanos normales expuestos al AA sobre la actividad espontánea de la aurícula de rata, considerando que la liberación del AA está asociada a las etapas tempranas de la activación linfocitaria.
3. Investigar las características de los linfocitos que intervienen en el fenómeno, teniendo en cuenta su grado de diferenciación o transformación.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

MATERIALES Y METODOS

1. Células efectoras:

Las células mononucleares periféricas de dadores normales y de pacientes con Leucemia Linfática Crónica (LLC) se obtuvieron por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque (168) a partir de sangre defibrinada para evitar contaminación plaquetaria.

Se diluyó la sangre al 1:2 con solución fisiológica y se sembró sobre Ficoll-Hypaque (densidad: 1,077) en relación 3:1 (v:v). Se centrifugó a 400 x g durante 45 minutos y se obtuvo la fracción de células mononucleares (monocitos y linfocitos) en la interfase, quedando los leucocitos 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 y finalmente se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 (RPMI) (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-SBF) a una concentración de 8×10^6 células.

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

1.1. Separación de distintas poblaciones celulares

1.1.1. Eliminación de células adherentes:

Las células mononucleares se incubaron durante 18 horas sobre superficies plásticas (adherencia al plástico). Se obtuvo así una suspensión de linfocitos con una pureza del 98%, determinado por tinción con peroxidasa.

1.1.2. Separación de linfocitos T y no T :

Los linfocitos se fraccionaron por la capacidad de formar rosetas con eritrocitos de carnero (rosetas E) (169). Una roseta se define en base a la presencia de un linfocito con 3 o más eritrocitos de carnero adheridos a su membrana. Se usó sangre ovina anticoagulada de origen comercial.

Se preparó una suspensión de linfocitos a una concentración de 10×10^4 células/ml y se mezcló con igual volumen de una suspensión de eritrocitos (E) lavados con solución fisiológica al 1% v:v en medio de cultivo. Se incubó 10 minutos a 37°C, se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y se dejó a 4°C durante 18 horas. Luego se resuspendió cuidadosamente y se sembró sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque (densidad: 1,077). Se centrifugó 30 minutos a 400 x g en frío. Se obtuvieron las células formadoras de rosetas (CFR) en el fondo de los tubos y las células que no forman rosetas en la interfase (no-CFR). Se separaron ambas fracciones y se lisaron con una solución hipotónica de ClNH₄.

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

Luego de la lisis las células se lavaron 3 veces con RPMI 1640, se colorearon con Turk y se contaron en cámara de Neubauer. Finalmente se resuspendieron en RPMI-1640 en una concentración de 8×10^6 células/ml.

Se obtuvieron así dos fracciones: una enriquecida en linfocitos T (linfocitos T) por su capacidad de formar rosetas E (CFR) y otra no formadora de rosetas (no-CFR) que comprendía otras poblaciones como B, K, nulas y linfocitos de baja afinidad por E (linfocitos no T). Tanto los linfocitos T como los linfocitos no T se mantuvieron a 37°C durante 18 horas en una estufa humidificada y gaseada con 5% de CO₂ antes del bioensayo.

1.1.3. Separación de las subpoblaciones T colaboradora/inductora y T supresora/citotóxica por lisis selectiva con anticuerpos monoclonales y complemento:

Las CFR se incubaron con 5-10 μ l de anticuerpo monoclonal OKT4, que reconoce linfocitos que expresan el Ag CD4, durante 30 minutos a 37°C, luego se agregaron 200 μ l de suero normal de conejo como fuente de complemento (C) y se incubaron las células durante 30 minutos a 37°C. Finalizada la lisis se inactivó la reacción con el agregado de medio de cultivo. Luego de 3 lavados con medio de cultivo se contaron las células y se ajustó la concentración a 8×10^6 células/ml.

El mismo procedimiento se llevó a cabo con las CFR y el anticuerpo monoclonal OKT8, que reconoce linfocitos que expresan el Ag CD8, y suero de conejo como fuente de complemento.

Luego de la lisis con OKT8 y C se obtuvo una población enriquecida en linfocitos T colaboradores/inductores (CD4) y luego de la lisis con OKT4 y C se obtuvo una población enriquecida en linfocitos T supresores/citotóxicos (CD8).

Las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8 fueron incubadas a 37°C durante 18 horas en una estufa humidificada y gaseada con 5% de CO₂, antes del bioensayo.

1.1.4. Determinación de las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8:

Las proporciones de las subpoblaciones CD4 y CD8 se determinaron mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Se incubaron los linfocitos T con 10ul de anticuerpo monoclonal OKT4 y OKT8 respectivamente durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron 3 veces con una solución de buffer fosfatos pH 7,2 con 0,1% de azida sódica, se eliminó el sobrenadante y se incubó con 15 µl de un suero anti-IgG Fab₂ conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Cappel) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron las células 3 veces con la solución de buffer fosfatos y al pellet final se le agregó una gota de buffer glicina pH 8,6 con 60% de glicerina; se colocó una gota entre porta y cubre objeto y se efectuó la lectura en un microscopio de fluorescencia con epiiluminación.

1.1.5. Viabilidad celular:

La viabilidad de las células luego de las purificaciones b en presencia de las diversas drogas empleadas se verificó por ensayo de exclusión de Azul Trypán, las células efectoras conteniendo mas del 80% de células viables, fueron usadas en los ensayos.

1.2. Pacientes:

Se estudiaron los linfocitos de sangre periférica de 14 pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfática Crónica (LLC) de origen B y de 2 pacientes con diagnóstico de LLC de origen T de fenotipo CD4⁺. El 80-90% de los linfocitos circulantes eran de origen B o T respectivamente. Estas determinaciones fueron efectuadas con anticuerpos policlonales y monoclonales que reconocen a antígenos específicos de las poblaciones B o T en sus distintos estadios de diferenciación. Los pacientes fueron referidos, luego de su diagnóstico y previo a su tratamiento específico, por los servicios de Clínica Médica y de Inmunología Oncológica del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina, y por el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigaciones Médicas " Alberto Einstein ".

Cada experimento fue realizado con células provenientes de un dador diferente. Tanto los dadores normales como los pacientes no habían tomado medicación alguna durante los 10 días previos al estudio.

1.3. Línea celular Raji:

Es una línea linfoblástico B derivada de un linfoma de Burkitt no productora de virus de Epstein Barr.

Las células Raji (Raji) fueron mantenidas en cultivo continuo en RPMI 1640; 10% de SBF, gentamicina 50ug/ml y anfotericina al 1% (170). Las Raji fueron cosechadas luego de 24,48 ó 72 horas, lavadas 3 veces en medio de cultivo y resuspendidas en RPMI libre de suero en una concentración de 8×10^6 /ml.

2. Preparación de aurícula aislada de rata:

Se sacrificaron ratas albino macho de la cepa Wistar y 200-250 g de peso por decapitación. Se extrajo rápidamente el corazón y se colocó en una cápsula 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⁺ 1,33 mM, PO₄³⁻ 1,2mM, Cl⁻ 125,0 mM, HCO₃⁻ 25,3mM, SO₄²⁻ 1,33mM, glucosa 5,5mM.

Se separaron las aurículas de los ventrículos, se disecaron cuidadosamente y se suspendieron de un sostén de vidrio sumergiéndolas 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 750 mg 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 o por debajo 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 los 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 (Dra Leonor Sterin-Borda).

3. Preparación de sobrenadantes libres de células

3.1. Sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de linfocitos T y de subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8 activados con PHA:

Los sobrenadantes fueron obtenidos por incubación de 0,5 ml de una suspensión de 8×10^6 linfocitos T, CD4 o CD8/ml con 10ug/ml de PHA durante 30 minutos a 37°C en estufa humidificada y gaseada con 5% de CO₂, seguida de una centrifugación durante 15 min a 800 x g. Los sobrenadantes control fueron preparados por incubación de los linfocitos con RPMI-SFB en ausencia de PHA. Los sobrenadantes libres de células fueron utilizados, inmediatamente después de su separación, en el bioensayo.

3.2. Sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de la población total de linfocitos, de la población de linfocitos T, no T y de las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8 incubados con ácido araquidónico (AA) :

Los sobrenadantes libres de células fueron obtenidos por incubación de 8×10^6 linfocitos en 1ml de RPMI-SFB conteniendo 4ul de una solución fresca de AA $1,5 \times 10^{-2}$ M durante 20 min a 37°C en estufa humidificada y gaseada con 5% de CO₂, seguida de una centrifugación a 800 x g durante 15 min. Las células sedimentadas fueron descartadas y 0,5 ml de los sobrenadantes de linfoci-

tos incubados con AA fueron usados inmediatamente.

4. Ensayo de proliferación:

Se estudió el efecto del AA sobre los linfocitos, incubando 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 (Difco Lab., USA) en presencia y en ausencia de AA en una concentración final de 10^{-7} M, 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 Ci/mmol). Se separaron las células con un cosechador automático; los linfocitos fueron retenidos sobre filtros de lana de vidrio. Los trozos de filtro correspondientes a cada pozo se colocaron en viales de centelleo y se les añadió solución centelladora (PPO 5 g, dimetil POPOP 250 mg, tolueno 1 litro, ácido acético 2 ml) y se contaron en un contador de centelleo líquido.

5. Curva de crecimiento de las células Raji en ausencia y en presencia de un inhibidor de la tromboxano sintetasa (L-8027):

Las células Raji (10 ml) en una concentración inicial de 1×10^5 células/ml, se cultivaron en RPMI-1640, 10% SFB en ausencia y

en presencia de L-8027 (10^{-9} M). Se tomaron alícuotas a las 24hs, 48hs y 72hs de cultivo para efectuar los recuentos celulares.

6. Radioconversión de $[1-^{14}\text{C}]$ AA en prostanoïdes:

El metabolismo de AA de células aisladas (Raji y LLC-B) fue estudiado incubando 40×10^6 células resuspendidas en 1ml de KRB con 1,25 μC de $[1-^{14}\text{C}]$ ácido araquidónico (A^*) de actividad específica: 40-60 mC/mmol (New England Nuclear) durante 2 horas a 37°C con agitación constante en un baño metabólico bajo una atmósfera de 95% O_2 -5% CO_2 . Al final del período de incubación la reacción se detuvo agregando 0,125 ml de ácido cítrico 1M. Los lípidos fueron extraídos 3 veces con 5 ml de cloroformo. El solvente orgánico se evaporó a 40°C . Los residuos lipídicos fueron disueltos en una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 y se efectuó una cromatografía en capa delgada sobre placas de plástico de 0,25 mm de espesor cubiertas con silica-gel, se corrió dos veces en un sistema de solventes consistente en una mezcla de benceno:dioxano:ácido acético (60:30:3, v:v). Los patrones de 6-ceto $\text{PGF}_1\alpha$, PGE_2 y TxB_2 fueron sembrados simultáneamente en todas las placas. Los patrones se visualizaron luego de pulverizar las áreas correspondientes con una solución al 10% de ácido fosfomolibdico en etanol y calentando a 110°C .

La radioactividad de los productos del metabolismo del AA en las distintas zonas del cromatograma fue estimado como el área

total de todas las fracciones luego de la sustracción del blanco. Las áreas de los radiopicos correspondientes a los distintos metabolitos fueron calculadas y expresadas como porcentaje del área total. La radioconversión del AA en prostanoides fue realizado por el Dr. Horacio Peredo en el CEFAPRIN.

7. Radioinmunoanálisis (RIA) de TxB₂:

La cantidad de TxB₂ en las alícuotas de extractos lipídicos de 40 x 10⁶ células Raji y de LLC-B se determinó por Radioinmunoanálisis, utilizando un kit de New England Nuclear, basado en el uso de tromboxano B tritiado como trazador y un suero de conejo anti TxB₂ como el antisuero (anticuerpo específico). Reactividad cruzada: PGD₂:2%, PGE₂:0,1%, PGF₂α : 0,1%, 6-ceto-PGF₁α : 0,08% y PGA₂: <0,005%.

8. Soluciones empleadas:

8.1. Solución de Turk para conteo 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 (8×10^4 células/ml) con el reactivo en una relación 1:10 durante 2 minutos y se cuenta.

Las células viables no se colorean.

8.3. Fitoheماغlutinina (PHA):

Se empleó fitoheماغlutinina (PHA), lectina de Phaseolus vulgaris tipo V (Sigma Chem. Co, USA) de modo de tener una concentración final de 10ug/ml

8.4. U-46619:

Es el análogo sintético del TxA_2 (Upjohn, Kalamazoo, MI).

Fue usado en un rango de concentraciones de $10^{-5}M$ a $10^{-7}M$.

8.5. Araquidonato de sodio:

El araquidonato de Na (AA) (5,8,11,14-eicosatetraenoato de sodio, Sigma Chem. Co., USA), se disolvió en agua a $1,8 \times 10^{-2}M$ y luego se lo utilizó en un rango de concentraciones finales de $4 \times 10^{-5}M$ a $8 \times 10^{-7}M$.

8.6. Anticuerpos monoclonales:

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales OKT4 y OKT8 (Ortho-Mune, Ortho Diagnostic Systems Inc. Raritan, NJ).

8.7. Inhibidores:

Se utilizaron soluciones recién preparadas de los siguientes reactivos:

a) Ácido acetilsalicílico (ASA) (Sigma Chem. Co, USA)

$1,8 \times 10^{-2} M$

b) indometacina (Merck, Sharp & Dohme, USA) $1 \times 10^{-6} M$

c) Ácido nordihidroguayaretico (NDGA) (Sigma Chem. Co, USA)

$1 \times 10^{-9} M$

d) ácido 5,8,11,14-eicosatetraínoico (ETYA) (Hoffmann-Laroche, Suiza) $1 \times 10^{-7} M$

e) 7-[3-(4-acetil-3-hidroxi-2-propil-fenoxi)-2-hidroxipropil]-4-oxo-propil-4 H-1-benzopirano-2 carboxilato de sodio (FPL-55712) (Fisons LTD, UK) $1 \times 10^{-7} M$

f) L-8027 (Nictindol) (Labaz Lab.) $10^{-9} M$

g) imidazol (Sigma Chemical Co.) $10^{-9} M$

La solución madre de indometacina se preparó en solución tamponada de fosfatos 0,1M a 1 mg/ml. El NDGA, el ETYA y el L-8027 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 ASA y de imidazol 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

afecto 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 aritmética \pm el error estándar de la misma.

Las curvas dosis-respuesta se construyeron de acuerdo al método de van Rossum (171) que emplea dosis acumulativas agregadas en alicuotas 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.

R E S U L T A D O S

RESULTADOS

1. MODIFICACION DE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DE LA AURICULA AISLADA DE RATA POR SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T HUMANOS NORMALES ACTIVADOS CON PHA

Se ha demostrado en nuestro laboratorio que los linfocitos humanos normales T activados con PHA (165) son capaces de aumentar tanto la tensión como la frecuencia de contracciones de la aurícula aislada de rata. La reacción es el resultado de la producción, durante el ensayo, de metabolitos oxidativos del AA, principalmente los leucotrienos que constituyen la SRS-A.

El propósito del presente estudio fue determinar la contribución de las subpoblaciones colaboradora/inductora (CD4) y supresora/citotóxica (CD8) al desarrollo de la reacción.

1.1. Efecto de las subpoblaciones de linfocitos T sobre la contractilidad de la aurícula de rata

Con el objeto de identificar la subpoblación de linfocitos T responsable de la estimulación de la actividad contráctil de la aurícula de rata, se trató a la población enriquecida en linfocitos T con un anticuerpo monoclonal OKT4, que reconoce linfocitos que portan el Ag CD4, y complemento o con un anticuerpo monoclonal OKT8, que reconoce linfocitos que portan el Ag CD8, y complemento; obteniéndose en el primer caso una población enrique-

cida en linfocitos CD8 y en el segundo caso una población enriquecida en linfocitos CD4.

Los resultados de la TABLA 1 resumen las características de las poblaciones efectoras CD4 y CD8 que fueron las utilizadas en los experimentos.

La contaminación de CD4 con CD8 fue del $1,3 \pm 0,5 \%$ y la contaminación de CD8 con CD4 fue del $2,3 \pm 0,6 \%$.

El agregado simultáneo de las subpoblaciones T y PHA (CD4-PHA o CD8-PHA) al preparado de aurícula de rata latiendo espontáneamente, alteró la tensión y la frecuencia de las contracciones; mientras que el agregado de PHA solo o de linfocitos CD4 o de linfocitos CD8 solos no afectaron en modo alguno la contractilidad cardíaca. Como puede observarse en la FIGURA 8, las células CD4-PHA aumentan considerablemente la actividad inotrópica y cronotrópica de la aurícula de rata mientras que los linfocitos CD8-PHA disminuyen la tensión contráctil.

Por lo tanto se deduce que el efecto inotrópico positivo de los T-PHA es el resultado del balance entre las respuestas de los CD4-PHA y de los CD8-PHA.

Los efectos observados fueron proporcionales al número de células efectoras agregadas al sistema (FIGURA 8).

Al igual que con la preparación de linfocitos T (165), los cambios en la contractilidad de la aurícula de rata se sucedieron poco tiempo después del agregado de las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8 y de la PHA y aumentaron con el tiempo (FIGURA 9).

1.1.2. Mecanismos de la reacción de las subpoblaciones CD4-PHA y CD8-PHA con la aurícula aislada de rata

Diferentes caminos del metabolismo del AA llevan a la producción de sustancias capaces de alterar la tensión y frecuencia de la aurícula de rata.

Con el objeto de determinar el mecanismo de la reacción, se utilizaron diversos inhibidores que actúan sobre las distintas vías del metabolismo del AA en concentraciones que por si mismas no afectan los valores de tensión y frecuencia de la contractilidad cardíaca ni la viabilidad de los linfocitos (TABLA 2).

Los resultados expuestos en la TABLA 3 indican que el efecto inotrópico positivo producido por las células efectoras CD4-PHA es ejercido a través de una vía que involucra a los leucotrienos que constituyen la SRS-A, ya que este efecto puede ser bloqueado por preincubación de la aurícula de rata con FPL-55712, un agente que impide la interacción de la SRS-A con sus receptores. La preincubación de la aurícula con indometacina exacerbó el efecto de las células CD4-PHA.

Por otro lado, la respuesta inotrópica negativa de la aurícula a la fracción CD8-PHA persistía tanto en presencia de indometacina como de FPL-55712 (TABLA 3).

1.3. Efecto de sobrenadantes libres de células activadas en la actividad contráctil de la aurícula de rata

Con el fin de determinar si la presencia continua de los linfocitos activados con PHA era necesaria para lograr el efecto biológico se dividió la reacción en 2 etapas: 1) se procedió a estimular a los linfocitos CD4 y CD8 con PHA durante 30 minutos a 37°C y 2) se recolectó el sobrenadante libre de células. Este sobrenadante fue el que se enfrentó con la preparación auricular. En los experimentos anteriores se agregaban al baño de ensayo las células suspendidas en medio de cultivo simultáneamente con la PHA.

Los resultados expuestos en la TABLA 4 demuestran que los sobrenadantes libres de células CD4-PHA estimulan la actividad inotrópica y cronotrópica de la aurícula. El efecto estimulante de estos sobrenadantes fue dependiente de la dosis, observándose un cambio significativo a partir de sobrenadantes obtenidos con $1,6 \times 10^6$ células CD4-PHA (datos no mostrados). Por lo tanto no era necesaria la presencia de los linfocitos CD4 activados para desencadenar la actividad contráctil de la aurícula aislada de rata.

El efecto depresor de los sobrenadantes CD8-PHA no era importante, en oposición al resultado obtenido con la preparación entera de CD8-PHA (células y sobrenadante).

La FIGURA 10 muestra el efecto del agregado de sobrenadantes de células CD4-PHA y de CD8-PHA al tejido auricular preincubado

con un inhibidor de la vía de la lipoxigenasa (NDGA), con FPL-55712 o un inhibidor de la ciclooxigenasa (indometacina).

Los resultados demuestran que la preincubación del tejido auricular con NDGA $10^{-5}M$ lo tornaba incapaz de responder al sobrenadante activo de CD4-PHA. Al igual que con la preparación de linfocitos estimulados con PHA, la preincubación de la aurícula con FPL-55712 bloqueaba el efecto inotrópico y cronotrópico positivo del sobrenadante de células CD4-PHA. Los sobrenadantes de linfocitos CD8-PHA no tenían un efecto significativo sobre las aurículas preincubadas con indometacina.

TABLA 1

Obtención de subpoblaciones de linfocitos humanos normales T (LT) por lisis con anticuerpos monoclonales y complemento:

Subpoblación de LT ^a	Recuperación de LT purificados ^b (%)	Recuperación calculada de LT ^c (%)	Viabilidad celular ^d (%)
CD4	59 ± 9	69 ± 1	80 ± 5
CD8	38 ± 8	31 ± 2	74 ± 5

^aLas células formadoras de rosetas (CFR) fueron deplecionadas de células portadoras de antígenos CD4 ó CD8, por tratamiento con 5 μ l de anticuerpos monoclonales OKT4 u OKT8 y 200 μ l de suero normal de conejo como fuente de complemento, como fue descrito en Materiales y Métodos. CD4: LT enriquecidos en células portadoras de antígeno CD4; CD8: LT enriquecidos en células portadoras de antígeno CD8.

^bLa recuperación de las distintas subpoblaciones de LT se calculó a partir del número de CFR y del número de células viables luego del tratamiento lítico con los anticuerpos monoclonales.

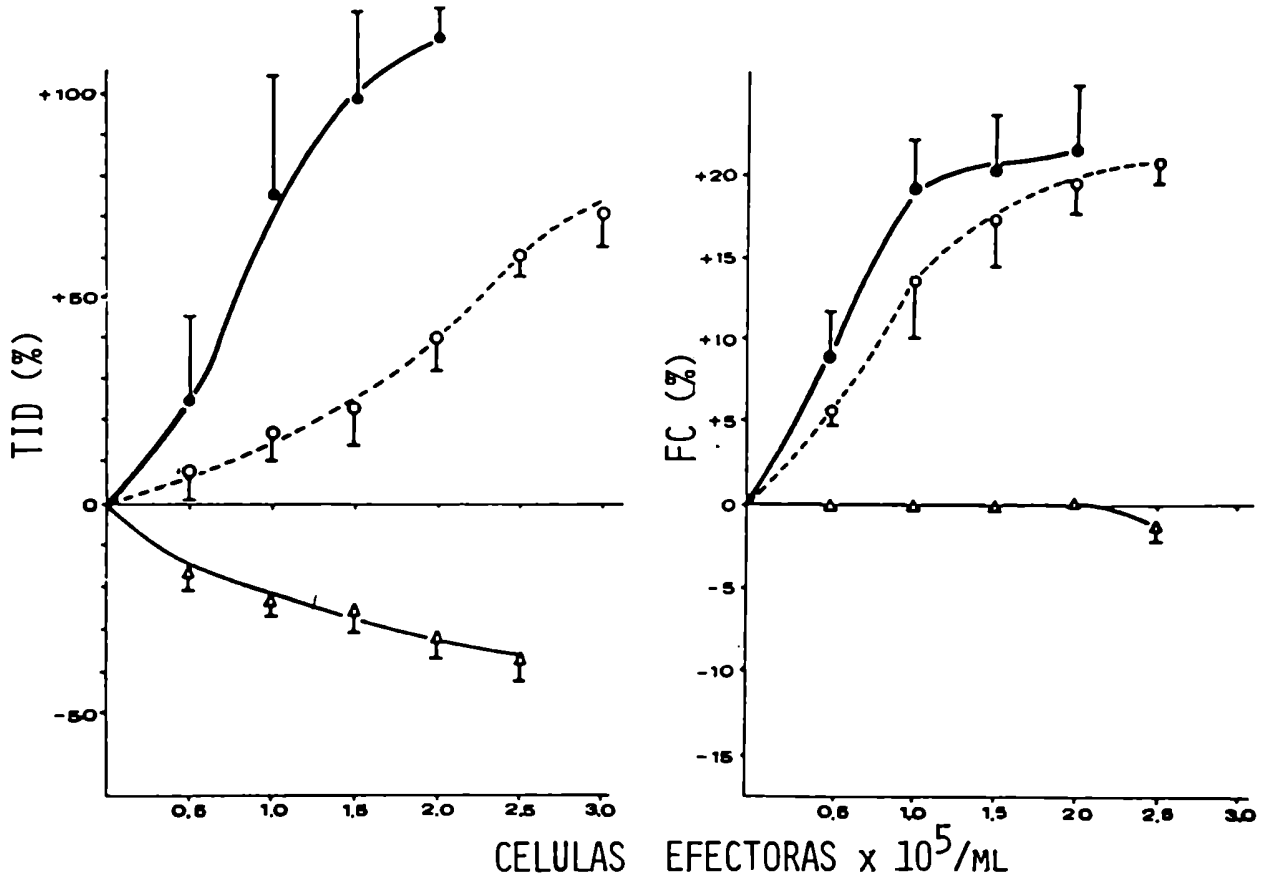
^cLa recuperación calculada se obtuvo considerando a las CFR como 100% de LT, y sustrayendo el % de linfocitos CD4 ó CD8 presentes en las CFR, determinados por inmunofluorescencia antes de la lisis con anticuerpos monoclonales.

^dLa viabilidad celular se calculó según el test de exclusión de azul tripan.

Los valores se expresan como la media aritmética ± el error estándar de 4 experimentos.

FIGURA 8

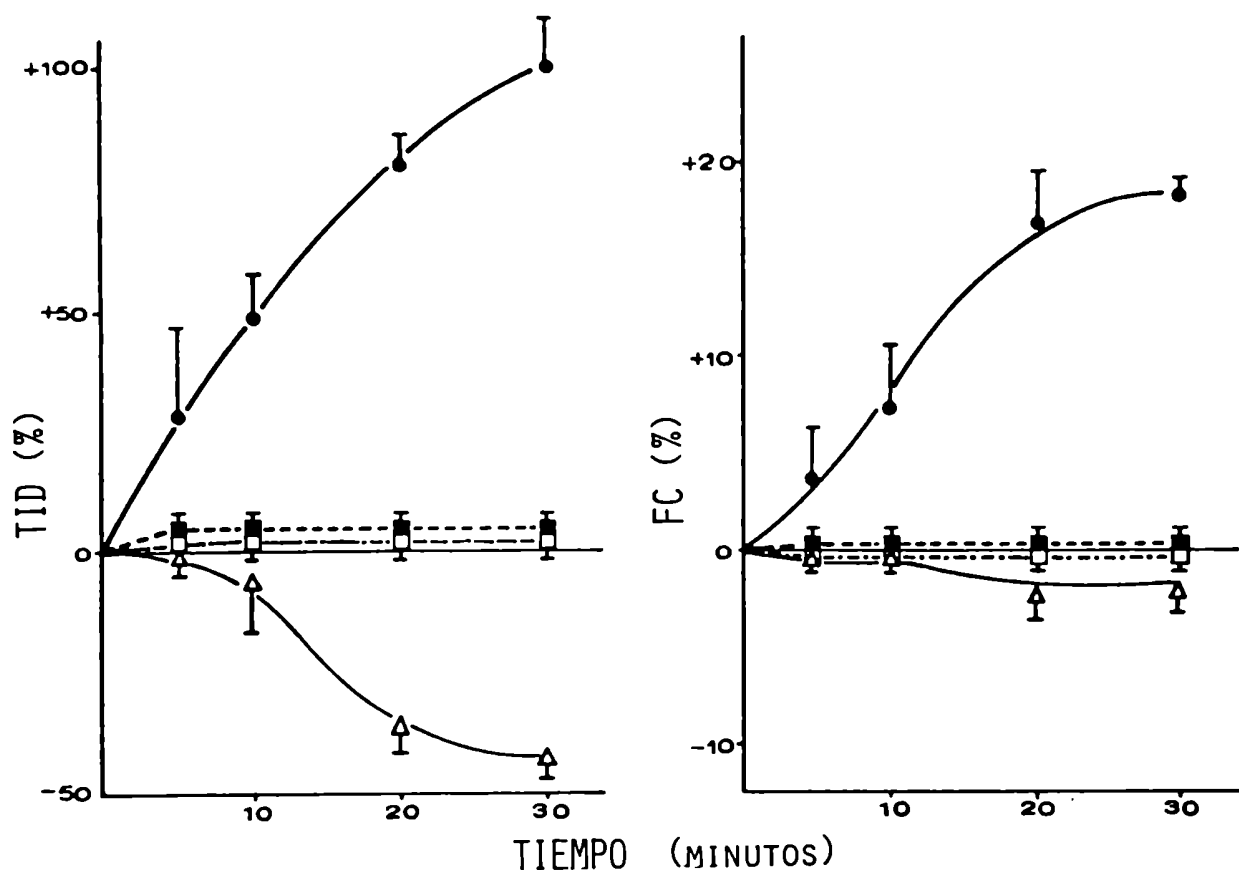
Efecto de distintas concentraciones de linfocitos T y de subpoblaciones de linfocitos T sobre la actividad contráctil de la aurícula de rata en presencia de PHA:



Se representan los cambios porcentuales de los valores iniciales de tensión (TID) y frecuencia (FC) de contracciones de la aurícula de rata que late espontáneamente en presencia de 10ug/ml de PHA después del agregado sucesivo de 0.5×10^5 /ml de linfocitos humanos normales T (○); linfocitos humanos normales T deplecionados de CD8 (●) o CD4 (△) por lisis diferencial con anticuerpos monoclonales OKT8 ó OKT4 y complemento (poblaciones enriquecidas en CD4 y en CD8 respectivamente). El intervalo de tiempo entre cada dosis era el requerido para obtener un efecto máximo y sostenido durante 3 minutos. Se grafican las medias aritméticas \pm error estándar de la media de 4 experimentos.

FIGURA 9

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



Se suspendió la aurícula aislada en solución de KRB con $1,6 \times 10^5$ de linfocitos CD4 (■) /ml, $1,6 \times 10^5$ linfocitos CD4/ml agregados simultáneamente con 10ug/ml PHA al baño de reacción (●), $2,5 \times 10^5$ linfocitos CD8/ml (□) y $2,5 \times 10^5$ linfocitos CD8/ml agregados simultáneamente con 10ug/ml de PHA (△).

Se representa la media aritmética \pm error estándar de la media de los cambios porcentuales de los valores iniciales de tensión (TID) y frecuencia de contracciones (FC) en función del tiempo de agregado de las células efectoras ó de las células efectoras con la PHA.

TABLA 2

Efecto de distintas drogas sobre la actividad contráctil espontánea de la aurícula aislada de rata y sobre la viabilidad de los linfocitos humanos normales:

Droga	TID(%)	FC(%)	n	Viabilidad(%)	n
Ninguna	1	1		95 ± 3	6
Indometacina	1,00 ± 0,08	0,96 ± 0,06	6	89 ± 3	4
ASA	1,02 ± 0,08	0,97 ± 0,04	7	ND	
NDGA	1,01 ± 0,08	0,99 ± 0,07	6	89 ± 2	5
ETYA	0,06 ± 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 ± el error estándar 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 3

Reacción de las subpoblaciones de linfocitos T humanos normales
activados con PHA con la aurícula aislada de rata en presencia de
Indometacina y FPL-55712:

Células efectoras - PHA que reaccionan con la aurícula en presencia de:	CD4 - PHA			CD8 - PHA		
	n	TID(%)	FC(%)	n	TID(%)	FC(%)
KRB	7	+89 ± 2	+14 ± 5	7	-24 ± 7	-4 ± 3
Indometacina	1	+140	+10	5	-29 ± 11	-4 ± 3
FPL-55712	4	+5 ± 3	3 ± 2	1	-40	0

Se agregaron $1,6 \times 10^5$ linfocitos CD4/ml y $2,4 \times 10^5$ linfocitos CD8*/ml en presencia de PHA (10ug/ml) a la aurícula aislada de rata preincubada durante 1 hora con Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) o KRB conteniendo Indometacina (10^{-6} M) o FPL-55712 (10^{-7} M). Se determinaron las medias aritméticas ± error estándar de la media de los cambios porcentuales de los valores iniciales de tensión (TID) y frecuencia (FC) de n experimentos a los 10-15 minutos del agregado de las células.

TABLA 4

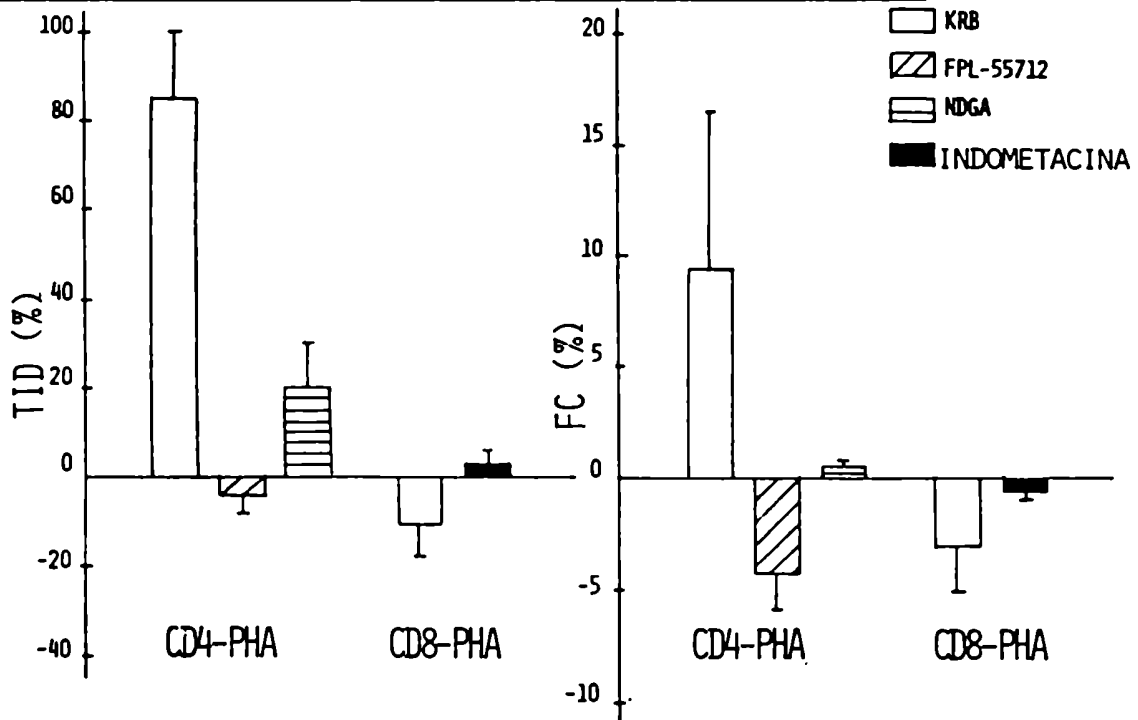
Efecto de sobrenadantes de linfocitos-T y de subpoblaciones CD4 y CD8 activados con PHA sobre la aurícula aislada de rata:

Sobrenadantes	n	TID (%)	FC (%)
T - PHA	3	+62 ± 34	+12 ± 7
CD4 - PHA	7	+70 ± 23	+9 ± 3
CD8 - PHA	6	-10 ± 17	-3 ± 5

Se suspendieron 5×10^6 linfocitos humanos normales CD4 o CD8 en 0,5 ml de medio de cultivo y se estimularon durante 30 minutos a 37°C con 10ug/ml de PHA. Los sobrenadantes libres de células se cosecharon luego de una centrifugación durante 15 minutos a 800 x g y se agregaron a la preparación de aurícula aislada de rata. Se determinó la media aritmética ± error estándar de los cambios porcentuales de tensión (TID) y frecuencia de contracciones (FC) de n experimentos 10 minutos después del agregado de los sobrenadantes.

FIGURA 10

Efecto de sobrenadantes de CD4-PHA o CD8-PHA sobre la aurícula de rata o sobre la aurícula de rata preincubada con inhibidores o antagonistas del metabolismo del ácido araquidónico:



SOBRENADANTES

Los sobrenadantes libres de células (0,5 ml) obtenidos a partir de 5×10^6 linfocitos humanos normales CD4 o CD8 activados con PHA se agregaron a la preparación de aurícula de rata preincubada durante 1 hora con: 15 ml de KRB, 15 ml de KRB + FPL-55712 (10^{-7} M), 15 ml de KRB + NDGA (10^{-9} M) o KRB + indometacina (10^{-6} M). Se determinaron los cambios porcentuales de los valores iniciales de tensión (TID) y frecuencia (FC) a los 10 minutos del agregado de los sobrenadantes a la aurícula. Los valores se expresan como la media aritmética \pm error estándar de la media de 6 experimentos. Las diferencias estadísticamente significativas, calculadas por el test t de student fueron:

Tensión:

CD4-PHA-KRB vs CD4-PHA-FPL-55712 $p < 0,02$

CD4-PHA-KRB vs CD4-PHA-NDGA $p < 0,05$

CD4-PHA-KRB vs CD8-PHA-KRB $p < 0,05$

Frecuencia:

CD4-PHA-KRB vs CD4-PHA-FPL-55712 $p < 0,05$

CD4-PHA-KRB vs CD4-PHA-NDGA $p < 0,05$

2. PAPEL DEL ACIDO ARAQUIDONICO (AA) EN EL EFECTO INOTROPICO Y CRONOTROPICO INDUCIDO POR LINFOCITOS HUMANOS NORMALES

Los resultados expuestos previamente demuestran que la subpoblación de linfocitos enriquecida en células CD4 y estimuladas con PHA inducen efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos sobre la aurícula aislada de rata, mientras que la subpoblación de linfocitos enriquecida en células CD8 y estimuladas con PHA induce efectos negativos. Los linfocitos CD4-PHA liberarían productos solubles capaces de inducir, por parte de la aurícula, la producción de metabolitos activos del AA provenientes de la vía de las lipoxigenasas.

En el proceso de activación linfocitaria con lectinas, se produce la movilización de los fosfolípidos de la membrana del linfocito y aumenta la disponibilidad de ácidos grasos libres, entre ellos el ácido araquidónico (172). Este podría servir de sustrato para la generación de metabolitos de lipoxigenasa y ciclooxigenasa por la aurícula. En el sistema de los linfocitos activados por la lectina, la especificidad de la reacción inotrópica positiva de los linfocitos CD4 podría estar ligada a la selectividad del estímulo (PHA) para esa población. Por esta razón quisimos verificar si el suministro exógeno de AA a los linfocitos humanos normales, en ausencia de otro estímulo era capaz de suplantar los pasos iniciales que suceden luego de la estimulación linfocitaria con PHA.

2.1. Efecto de linfocitos tratados con AA sobre la contractilidad cardíaca

Como lo demuestra la FIGURA 11, el agregado de linfocitos en una concentración de 4×10^5 /ml o de AA en una concentración de 8×10^{-7} M, a la preparación de aurícula aislada de rata, no modificaba su actividad contráctil. Sin embargo el agregado simultáneo de linfocitos y AA (L-AA) o de L preincubados con AA a 37°C durante 30 min (L-AA), en las mismas concentraciones mencionadas previamente, indujo un aumento considerable de la tensión y frecuencia contráctiles. Este efecto aumentó con el tiempo llegando a un valor máximo de tensión a los 15 min de la reacción y de frecuencia a los 5 minutos.

2.1.1 Mecanismo de la reacción

Para determinar el mecanismo de la reacción de L-AA con la aurícula, se utilizaron inhibidores de diversas vías del metabolismo del AA que podrían resultar en la estimulación de la tensión y frecuencia de la contractilidad cardíaca. Los resultados tal como lo indica la FIGURA 12 demuestran que la inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa por indometacina o ASA no bloqueaba los efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos de L-AA. En cambio un inhibidor de la vía de la lipoxigenasa, el NDGA, interfirió con la reacción del AA sobre la aurícula. También el ETYA en concentraciones que no tienen efecto sobre la

actividad de la ciclooxigenasa pero sí lo tienen sobre la lipoxigenasa, bloqueaba eficazmente tanto los efectos inotrópicos como los cronotrópicos de los L-AA.

2.2. Curvas dosis respuesta de AA en presencia y ausencia de linfocitos

Se comparó la respuesta al AA de la aurícula aislada de rata en ausencia y en presencia de linfocitos.

Mediante una curva dosis-respuesta de tipo acumulativo, FIGURA 13, se comprobó que el AA en un rango de concentraciones de 2×10^{-4} M a 1×10^{-5} M indujo el aumento de tensión de la aurícula. No se observó ningún efecto en la frecuencia de las contracciones. Luego se realizó la misma curva dosis-respuesta pero en presencia de 4×10^5 L/ml. La presencia de los linfocitos potenció significativamente este efecto alcanzando la curva dosis respuesta su valor máximo con una concentración de AA de 5×10^{-4} M; mientras que en ausencia de linfocitos el efecto máximo se logró con una concentración de AA de 1×10^{-5} M. Asimismo, la curva dosis-respuesta en presencia de los linfocitos se desplazó hacia la izquierda respecto de la curva obtenida con AA solo, lo que significa que los linfocitos aumentan la potencia y eficiencia de la droga. En presencia de linfocitos se observó una acción cronotrópica positiva del AA.

2.3. Efecto de inhibidores del metabolismo del AA en la acción del AA sobre la aurícula de rata en ausencia de linfocitos

La preincubación de la aurícula aislada con inhibidores de la ciclooxigenasa como ser indometacina o ASA bloqueó totalmente el efecto cardioestimulante ejercido por la presencia única de AA; contrariamente NDGA y ETYA (inhibidores de las lipoxigenasas) no modificaron este efecto (FIGURA 14).

2.4. Efecto de inhibidores del metabolismo del AA sobre la acción del AA en presencia de linfocitos

Se estudió la influencia de distintos inhibidores del metabolismo oxidativo del AA sobre los efectos inotrópicos y cronotrópicos de este ácido en presencia de linfocitos. Se puede observar en la FIGURA 15 que la inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa por ASA no modificó la acción inotrópica a bajas concentraciones de AA, pero las redujo significativamente a altas concentraciones. Cuando se preincubó la aurícula con FPL-55712, la curva dosis-respuesta inotrópica de L-AA se desvió a la derecha y el efecto total fue significativamente menor. Contrariamente, la acción cronotrópica del AA en presencia de linfocitos no fue alterada cuando se preincubó a la aurícula con ASA.

El efecto inotrópico positivo fue inhibido con el bloqueo simultáneo de ambos caminos enzimáticos. Con NDGA y ETYA los resultados fueron los mismos que los obtenidos con el uso del an-

tagonista de la SRS-A (FPL-55712).

2.5 Curva dosis respuesta al AA en presencia de linfocitos humanos normales T y no T

Se separaron los linfocitos totales por el método de rosetas con glóbulos rojos de carnero y centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque, obteniéndose poblaciones enriquecidas en linfocitos T y no T respectivamente. Se realizó una curva dosis-respuesta de tipo acumulativa (FIGURA 16) y se comprobó que tanto la población de linfocitos T como no T sensibilizan la aurícula al efecto inotrópico positivo del AA.

2.6 Curva dosis-respuesta al AA en presencia de subpoblaciones CD4 y CD8

Se realizaron curvas dosis-respuesta al AA en presencia de subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8 con el objeto de determinar el efecto de las distintas subpoblaciones inmunoregulatorias sobre la aurícula aislada en presencia de dosis acumulativas de AA. Ambas subclases de linfocitos sensibilizan la aurícula al efecto inotrópico positivo del AA (FIGURA 17), indicando que no existe una especificidad con respecto a una u otra subclase de linfocitos. Estos resultados contrastan con aquellos descritos para linfocitos humanos normales activados con PHA, caso en el que se encontró que solamente la población CD4 era la responsable

del efecto estimulante (FIGURAS 8 y 9).

2.7. Efecto de sobrenadantes de linfocitos expuestos al AA en la tensión y frecuencia de la aurícula aislada de rata

Con el objeto de investigar si el contacto directo entre linfocitos estimulados con AA y la aurícula era necesario para lograr el efecto estimulante, la reacción se dividió en dos etapas. Primero, los linfocitos fueron expuestos al AA y luego el sobrenadante de esta reacción fue separado de las células y agregado a la aurícula aislada de rata.

Los resultados expuestos en la TABLA 5, demuestran que los factores solubles derivados de la interacción del AA con los linfocitos pueden reemplazar a los linfocitos intactos.

El efecto producido por el sobrenadante de L-AA requiere la presencia de las lipoxigenasas activas de la aurícula, ya que este efecto no ocurre cuando la aurícula es previamente tratada con NDGA. Con el agregado previo de FPL-55712 al tejido auricular, el efecto también desaparecía. Esto indica que los compuestos suscitados por el estímulo son similares ya sea cuando se suministran los L-AA o los sobrenadantes de L-AA.

2.8. Efecto de sobrenadantes de subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8 expuestos al AA sobre la contractilidad cardíaca

Al igual que con los linfocitos totales se procedió a incu-

bar a los linfocitos no T y a las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8 con AA durante 30 minutos a 37°C, luego se centrifugó la suspensión de células y el sobrenadante obtenido se enfrentó con la aurícula aislada. Los resultados que se exponen en la TABLA 6 demuestran que los sobrenadantes de todas las subpoblaciones ejercen un efecto inotrópico positivo al igual que las células intactas.

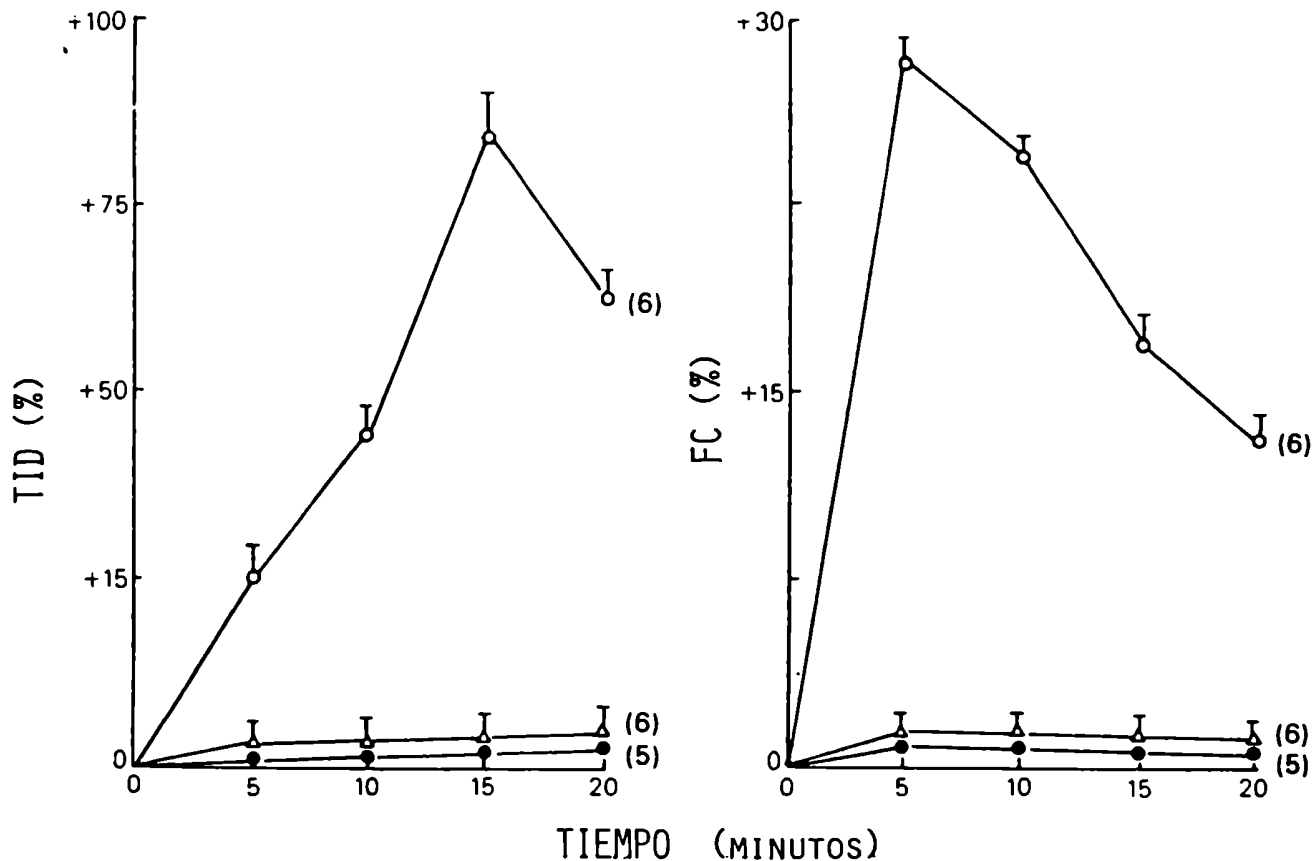
2.9. Efecto del AA sobre la proliferación de linfocitos humanos normales

De los experimentos previos se concluye que el agregado de AA exógeno a los linfocitos suplanta en muchos aspectos a la PHA como estímulo para el efecto inotrópico y cronotrópico evaluado en el sistema de contractilidad cardíaca. En forma paralela se procuró determinar si el AA exógeno en las condiciones experimentales del bioensayo modificaba la proliferación basal de linfocitos o la proliferación inducida por la PHA.

Los linfocitos fueron estimulados con PHA en ausencia y presencia de AA 10^{-7} M. Los resultados obtenidos indican que el AA no bastó per se como señal proliferativa ni modificó la respuesta linfocitaria a la PHA (TABLA 7).

FIGURA 11

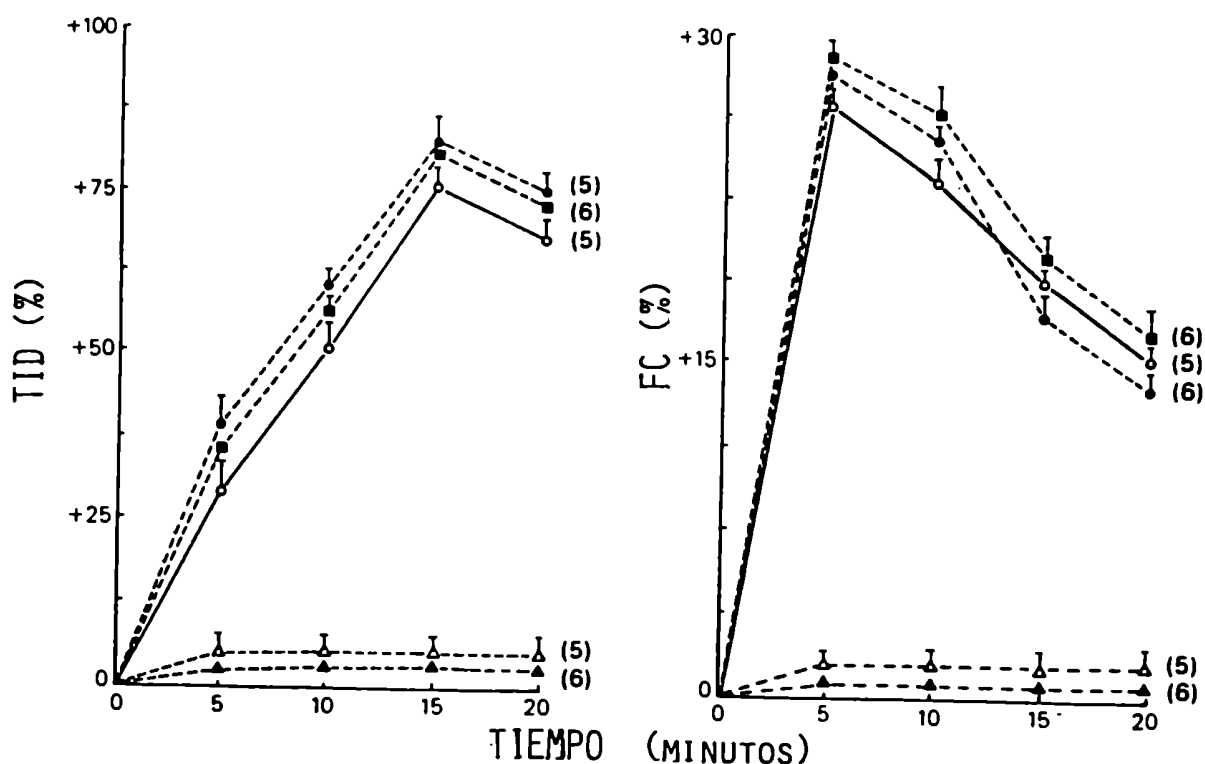
Cinética de la reacción de linfocitos humanos normales tratados con ácido araquidónico con la aurícula aislada de rata:



Se suspendió a la aurícula aislada de rata en KRB conteniendo 1 ml de una suspensión de 4×10^6 linfocitos/ml (●), 1 ml de una dilución recién preparada de AA 12×10^{-6} M en RPMI (▲) o 1 ml de una suspensión de 4×10^6 linfocitos/ml preincubados durante 30 minutos con AA 12×10^{-6} M (○). La molaridad final del AA en el baño de reacción fue de 8×10^{-7} . Se representa la media aritmética \pm error estándar de la media de los cambios porcentuales de tensión (TID) y frecuencia (FC). El número de experimentos figura entre paréntesis.

FIGURA 12

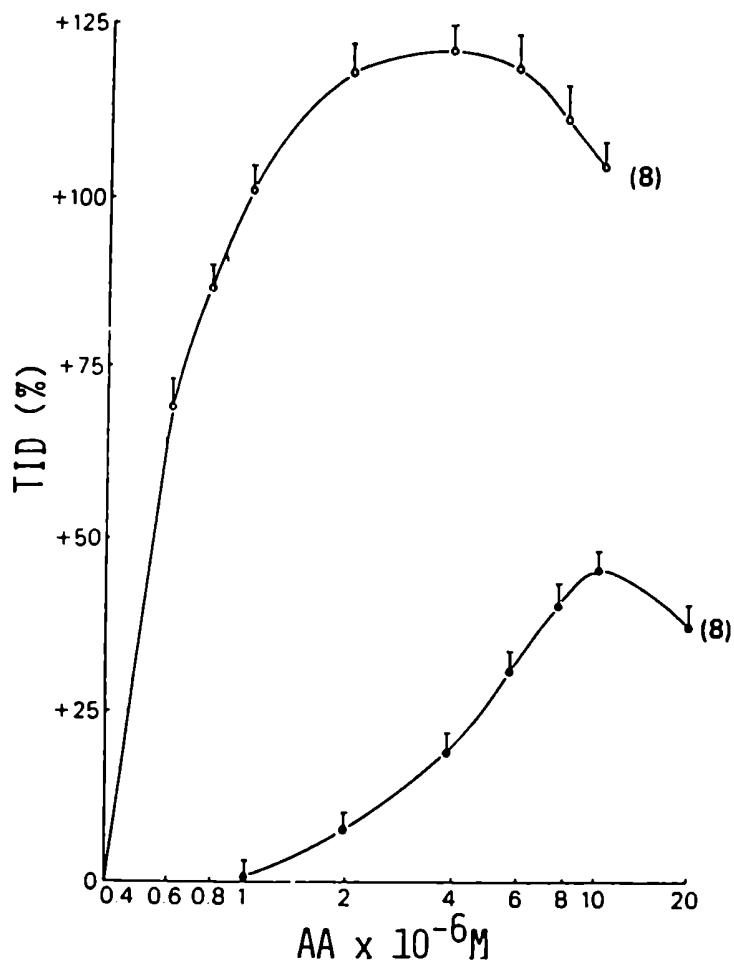
Cinética de la reacción de linfocitos humanos normales tratados con ácido araquidónico con la aurícula aislada de rata en presencia de inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico:



1 ml de una suspensión de 4×10^6 linfocitos/ml preincubados durante 30 minutos a 37°C con AA 12×10^{-6} M se enfrentaron con la preparación de aurícula aislada de rata suspendida en 15 ml de KRB (○) o en KRB conteniendo uno de los siguientes inhibidores: ASA $1,8 \times 10^{-6}$ M (■); indometacina 1×10^{-6} M (●); NDGA 1×10^{-5} M (▲) o ETYA 10^{-7} M (△). Los valores basales de tensión (TID) y frecuencia contráctil (FC) se tomaron con cada uno de los inhibidores o con KRB y se representan los cambios porcentuales (media \pm error estándar de la media) después del agregado de los linfocitos. El número de ensayos figura entre paréntesis.

FIGURA 13

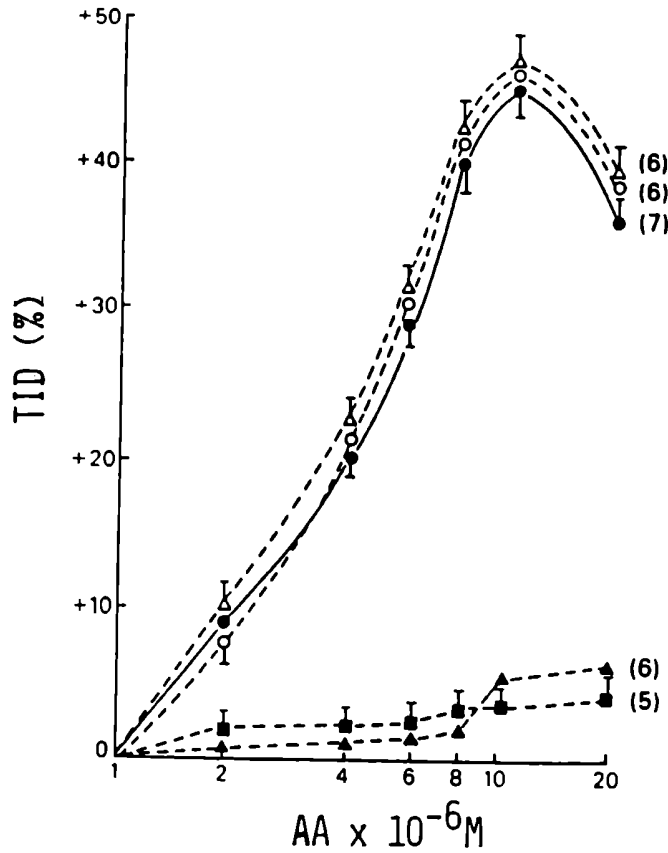
Efecto del ácido araquidónico sobre la aurícula aislada de rata en presencia y en ausencia de linfocitos humanos normales :



Se incubó la aurícula aislada de rata en 15 ml de KRB durante 30 minutos con 1 ml de RPMI conteniendo 4×10^4 linfocitos (○) o 1 ml de RPMI (●). Se construyó una curva acumulativa dosis respuesta agregando cantidades crecientes de AA a intervalos de 3 a 5 minutos. Se determinaron las medias aritméticas \pm error estándar de la media de los cambios porcentuales de los valores iniciales de tensión (TID). El número de experimentos figura entre paréntesis.

FIGURA 14

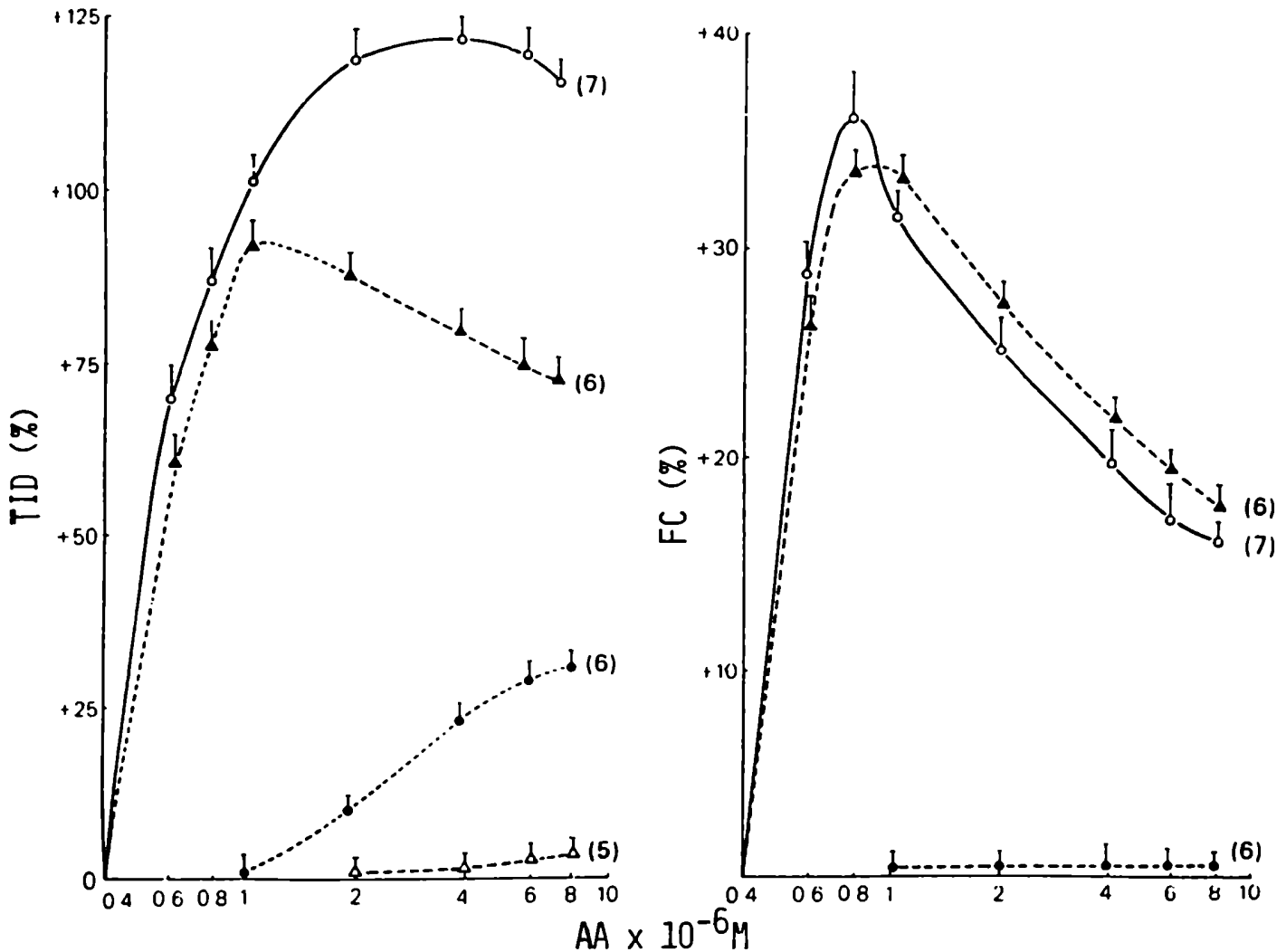
Efecto de inhibidores y antagonistas del metabolismo del ácido araquidónico sobre la acción del ácido araquidónico sobre la aurícula aislada de rata:



La aurícula aislada de rata fue suspendida en 15 ml de KRB (●) o preincubada durante 30 minutos en presencia de :indometacina 10^{-4} M (■); ASA $1,8 \times 10^{-4}$ M (▲); NDGA 10^{-5} M (○) o ETYA 10^{-7} M (△). Se construyó una curva acumulativa dosis-respuesta agregando cantidades crecientes de AA a intervalos de 3 a 5 minutos. Se determinaron los cambios porcentuales de TID (media aritmética \pm error estándar de la media). El número de experimentos figura entre paréntesis.

FIGURA 15

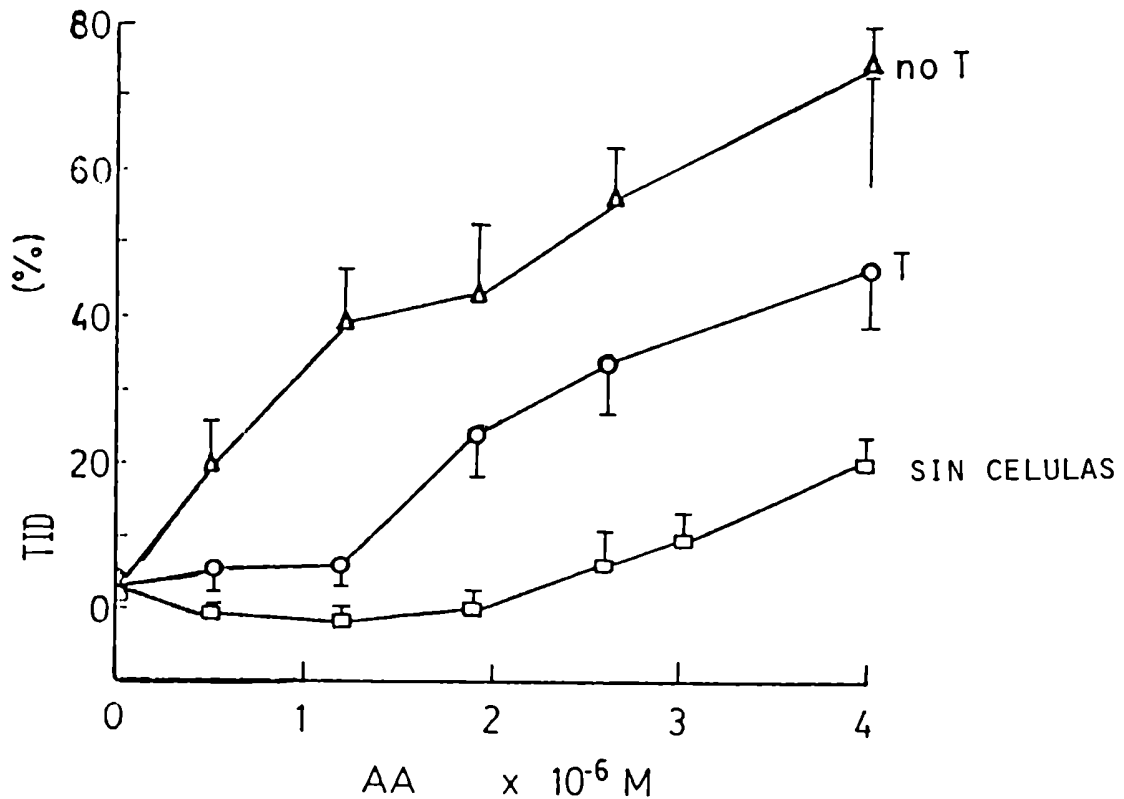
Efecto de inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico
sobre la acción del ácido araquidónico con la aurícula aislada
de rata en presencia de linfocitos humanos normales:



La aurícula aislada de rata fue suspendida en 15 ml de KRB (○) o en 15 ml de KRB con el agregado de: ASA $1,8 \times 10^{-4}$ M (▲); FPL-55712 10^{-7} M (●) o ASA $1,8 \times 10^{-4}$ M + FPL-55712 10^{-7} M (△) e incubada durante 30 minutos. Se agregó a continuación en todos los casos 1 ml de RPMI conteniendo 4×10^4 linfocitos humanos normales y se construyó una curva acumulativa dosis respuesta con el agregado de cantidades crecientes de AA a intervalos de 3 a 5 minutos. Se determinaron los cambios porcentuales de los valores iniciales de tensión (TID) y de frecuencia contráctil (FC). Se determinó la media aritmética \pm error estándar de la media de n experimentos según figuran entre paréntesis.

FIGURA 16

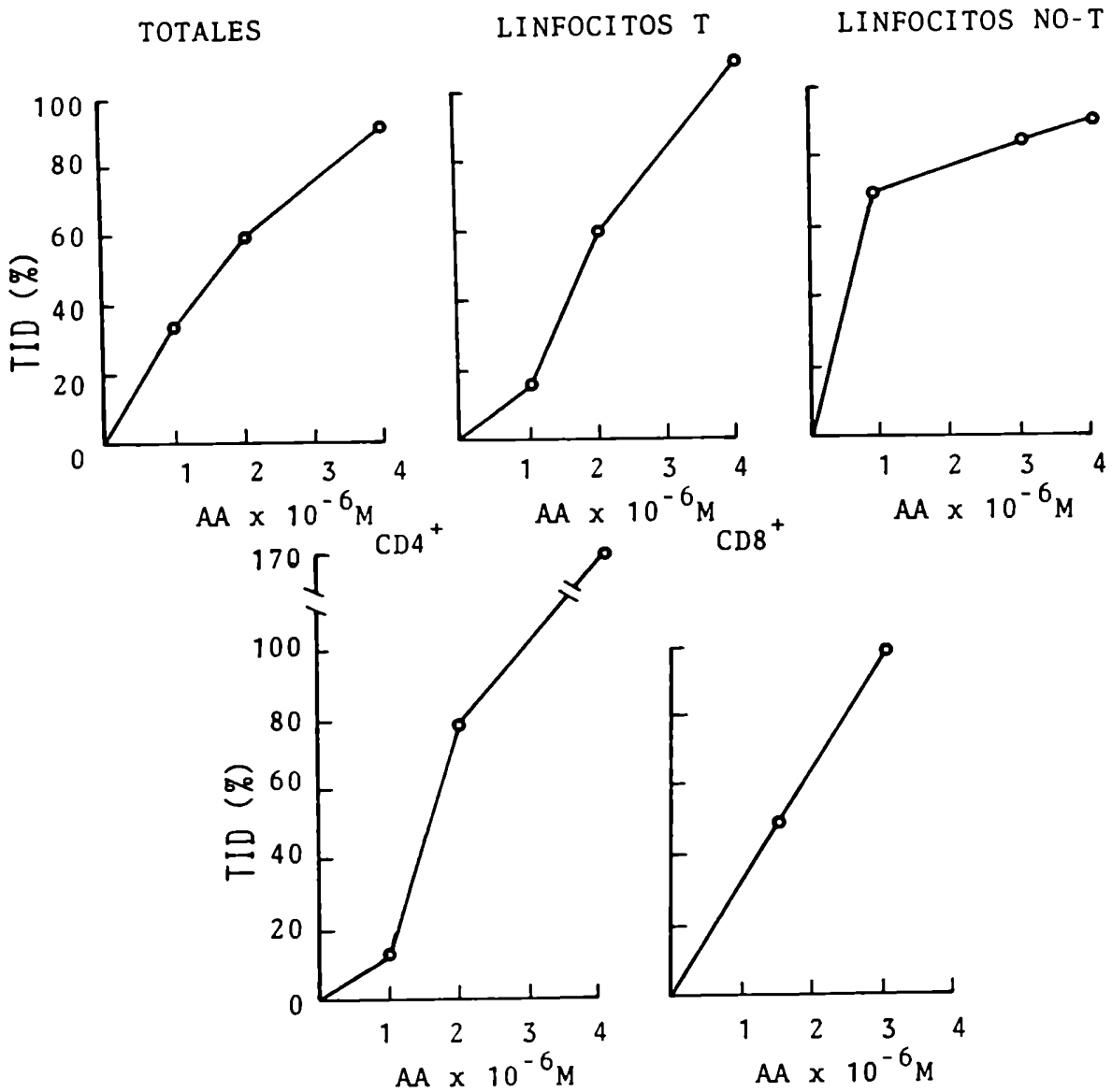
Efecto del ácido araquidónico en presencia de linfocitos humanos normales T y no T sobre la contractilidad cardíaca:



Se añadieron 0,5 ml de RPMI conteniendo 4×10^4 linfocitos T (5 experimentos) o linfocitos no T (6 experimentos) a la aurícula de rata latiendo espontáneamente en 15 ml de KRB. Se construyó una curva acumulativa dosis-respuesta agregando cantidades crecientes de AA a intervalos de 3 a 5 minutos, en ausencia y en presencia de células. Se determinaron los cambios porcentuales de los valores iniciales (media aritmética \pm error estándar de la media) de tensión (TID).

FIGURA 17

Efecto del ácido araquidónico en presencia de poblaciones y de subpoblaciones (CD4 y CD8) de linfocitos humanos normales sobre la contractilidad cardíaca:



Se añadieron 0,5 ml de RPMI conteniendo 4×10^4 linfocitos totales, T, no-T, CD4 o CD8 a la aurícula aislada de rata latiendo espontáneamente en 15 ml de KRB. Se construyeron curvas acumulativas dosis-respuesta agregando cantidades crecientes de AA a intervalos de 3 a 5 minutos. Se determinaron los cambios porcentuales de los valores iniciales de tensión (TID). El AA (4×10^{-6} M) en ausencia de los linfocitos sólo incrementó la TID: + 20%. Se presentan los resultados de un experimento representativo de cuatro.

TABLA 5

Efecto de sobrenadantes de la reacción de linfocitos humanos normales (L) con el AA sobre la aurícula aislada de rata:

Sobrenadantes	Aurícula	TID (%)	FC (%)	n
L	KRB	+ 5,0 ± 2,5	0	5
L-AA	KRB	+46,0 ± 7,3	+15,9 ± 1,3	5
L-AA	NDGA + KRB	+ 6,0 ± 1,9	0	4
L-AA	FPL-55712 + KRB	+ 4,7 ± 2,6	0	4

Se añadieron los sobrenadantes (0,5 ml), obtenidos de la incubación durante 30 minutos a 37°C de 4×10^6 linfocitos con 2 ul de AA $1,5 \times 10^{-2}$ M, a la aurícula de rata suspendida en KRB ó preincubada durante 30 minutos con NDGA 10^{-5} M o FPL-55712 10^{-7} M. Se determinaron los cambios porcentuales de los valores iniciales de tensión (TID) y frecuencia de contracciones (FC) 10 minutos después del agregado de los linfocitos o de los sobrenadantes. Se tabula la media aritmética ± error estándar de la media de n experimentos.

TABLA 6

Efecto de los sobrenadantes de la reacción de las subpoblaciones de linfocitos humanos normales CD4 y CD8 y no T con ácido araquidónico sobre la aurícula aislada de rata:

Sobrenadantes de:	TID (%)	n
Linfocitos CD4 + AA	37 ± 0	3
Linfocitos CD8 + AA	46 ± 18	3
Linfocitos no-T + AA	39 ± 12	3

Se añadieron a la preparación de aurícula de rata 0,5 ml del sobrenadante obtenido luego de la incubación durante 30 minutos a 37°C de 4×10^6 linfocitos CD4, CD8 o no-T con 2 µl de AA $1,5 \times 10^{-2}$ M y se determinaron los cambios porcentuales de tensión (TID) a los 10 minutos del agregado de los sobrenadantes. Se tabula la media aritmética ± error estándar de la media de n experimentos.

TABLA 7

Efecto del ácido araquidónico sobre la proliferación de linfocitos humanos normales:

	n	Incorporación de ³ H-timidina (cpm)	
		linfocitos + PHA	linfocitos
Control	7	25319 ± 4650	725 ± 176
AA 10 ⁻⁷ M	7	25243 ± 4540	779 ± 198

La captación de ³H-timidina de linfocitos + PHA y de linfocitos se determinó a la 72 hs en ausencia (control) y en presencia de AA 10⁻⁷ M, tal como se describió en Materiales y Métodos. Se expresa la media aritmética ± error estándar de la media de n experimentos en cuentas por minuto (cpm).

3. EFECTO DE CELULAS LEUCEMICAS Y LINFOBLASTOIDEAS SOBRE LA CONTRACTILIDAD CARDIACA

En las secciones previas se demostró que el efecto total de los linfocitos sobre la respuesta de la aurícula de rata al AA resulta de la contribución de las diferentes subpoblaciones y clases de linfocitos sin estímulo adicional. Con el objeto de investigar si el efecto observado podría estar relacionado al estado de activación o diferenciación celular, se examinó el comportamiento de linfocitos transformados de pacientes con LLC-B, LLC-T y células linfoblastoideas B creciendo en cultivo continuo (línea celular Raji) sobre la contractilidad cardíaca.

3.1. Efecto de células leucémicas sobre la contractilidad cardíaca

Contrariamente a lo demostrado para los linfocitos humanos normales T y no T, los 2 casos de LLC-T y 10 de las 14 LLC-B estudiadas tenían un efecto inotrópico negativo directo sobre la aurícula (o sea sin el agregado de AA), 2 casos tenían un efecto inotrópico positivo directo y los otros dos casos restantes presentaban un comportamiento análogo al de los linfocitos humanos normales (FIGURA 18). La actividad de las células leucémicas no fue afectada significativamente por el agregado de AA exógeno en concentraciones por debajo de $2 \times 10^{-6} M$, ya que a concentracio-

nes por encima de la indicada, el AA tiene un efecto estimulatorio per se (FIGURA 14). El agregado de un número similar de células muertas o de sobrenadantes libres de células no tenían efecto sobre la tensión contráctil (datos no mostrados).

La preincubación de células de LLC-B con L-8027 bloqueaba su efecto inotrópico negativo. El efecto inotrópico positivo de uno de los 2 casos estudiados (el otro caso de efecto inotrópico positivo no pudo ser evaluado) también desapareció cuando las células eran preincubadas con L-8027 (10^{-5} M) (FIGURA 19).

3.2. Efecto de células Raji sobre la contractilidad cardíaca

Las células Raji también redujeron la tensión contráctil (TABLA 8) mientras que la frecuencia de las contracciones permaneció sin cambio. El efecto inotrópico negativo de las Raji se vió exagerado con el agregado de AA exógeno (FIGURA 20). En presencia de AA ($1,98 \times 10^{-6}$ M) el comportamiento de las células Raji fue equivalente al del análogo sintético del TxA_2 , U-46619 (173) en una concentración de 10^{-7} M. El efecto fue mayor para las células cosechadas luego de 48-72 horas de cultivo (TABLA 8).

3.2.1. Efecto de inhibidores de la síntesis de Tromboxanos y Prostanoides sobre las células Raji

Para determinar el rol de los metabolitos del AA en la

reacción de las Raji con la aurícula latiendo, se preincubaron las células con inhibidores de la vía de la ciclooxigenasa (ASA, indometacina) e inhibidores de la síntesis de TxA_2 (L-8027, imidazol). Los resultados de la TABLA 9 demuestran que la vía de la ciclooxigenasa en las Raji es necesaria para el desarrollo del efecto inotrópico negativo.

Como tanto el L-8027 como el imidazol inhibían la reacción; probablemente el TxA_2 sería la especie activa involucrada.

3.2.2. Efecto del L-8027 (inhibidor de la tromboxano-sintetasa) sobre el crecimiento de la línea celular Raji

La FIGURA 21 muestra la curva de crecimiento normal de las células Raji entre las 0 y las 72 horas de cultivo. El agregado de L-8027 (inhibidor de la tromboxano-sintetasa) hacía más lento el crecimiento de las células Raji.

Los resultados obtenidos sugieren que el L-8027 frena el crecimiento de las células Raji por su acción sobre la actividad de la tromboxano-sintetasa indicando así que estas células poseen caminos metabólicos dependientes de los tromboxanos. El TxA_2 ejercería un efecto modulador sobre el crecimiento de las células Raji.

3.3. Producción de metabolitos del AA por células Raji y de LLC-B

Con el objeto de encontrar una evidencia directa de la

síntesis de tromboxanos en células transformadas se incubaron células de la línea Raji y de LLC-B con AA radioactivo. La conversión de AA radioactivo en 6-ceto-prostaglandina $F_{1\alpha}$ (metabolito no enzimático de la PGI_2), prostaglandina E_2 y TxB_2 fue determinada por medio de una cromatografía en capa delgada.

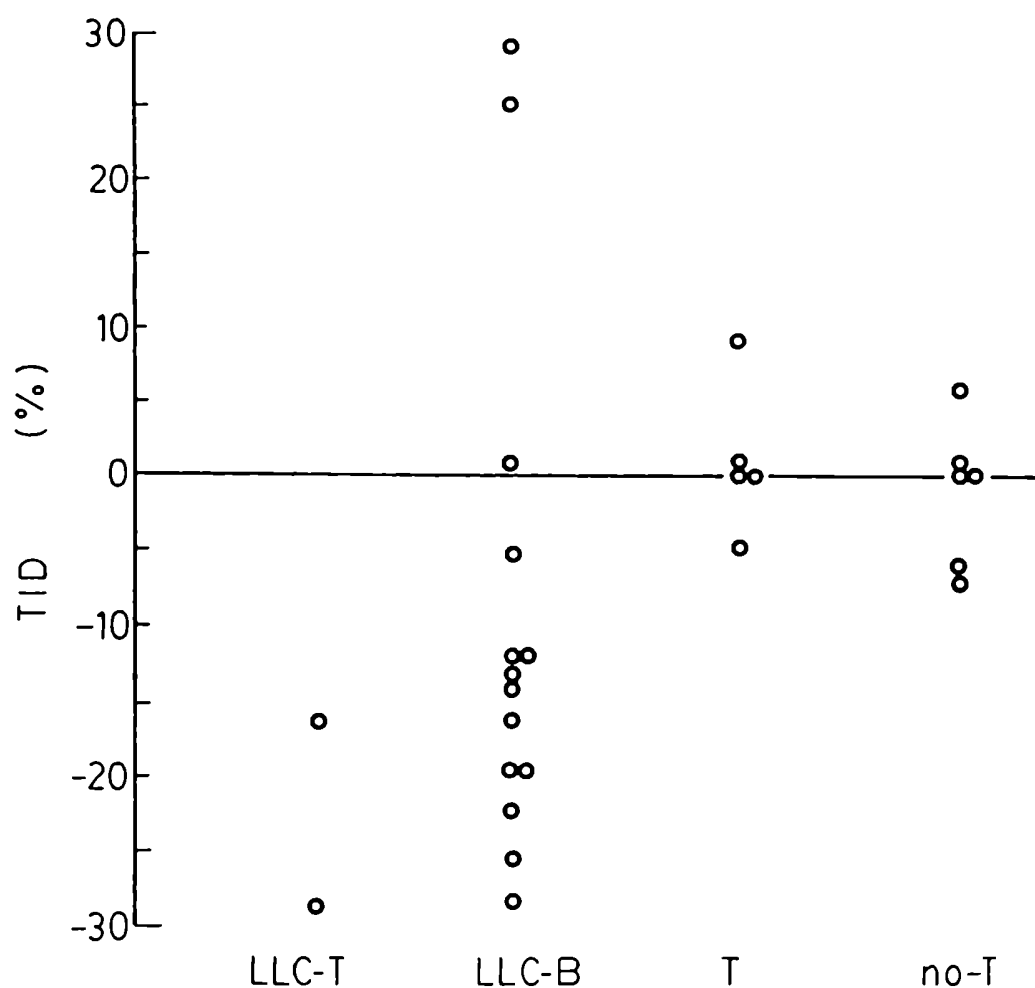
Los resultados de la radioconversión (TABLA 10) demuestran que las Raji y las células LLC-B pueden metabolizar el AA* exógeno a través de la vía de la ciclooxigenasa, siendo el TxB_2 el producto final que se encuentra en mayor concentración.

3.4. Determinación de Tromboxanos por RIA

La producción de TxB_2 , producto estable de este camino metabólico fue medido por RIA en ausencia de AA exógeno. Los resultados de la TABLA 10 confirman que los tromboxanos son producidos tanto por las células de las LLC-B como por las Raji. En consecuencia, la producción de TxA_2 por las células transformadas podría estar involucrada en su efecto inotrópico negativo.

FIGURA 18

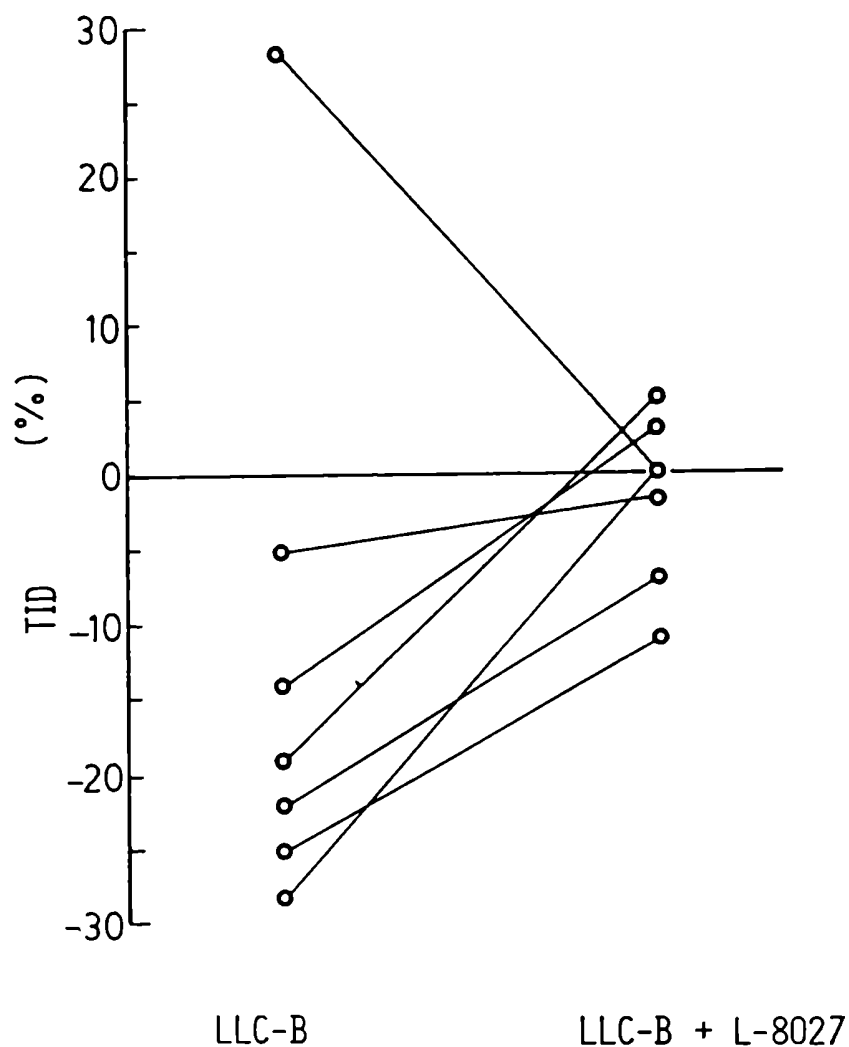
Efecto de linfocitos leucémicos y de linfocitos humanos normales sobre la actividad contráctil de la aurícula aislada de rata:



Se agregaron 0,5 ml de RPMI conteniendo 4×10^4 células de LLC-B (n=14), LLC-T (n=2), T normales (n=5) o no-T (n=6) a la preparación de aurícula de rata latiendo en 15 ml de KRB. Se determinaron los cambios porcentuales de los valores de tensión (TID). n: número de pacientes o de dadores normales.

FIGURA 19

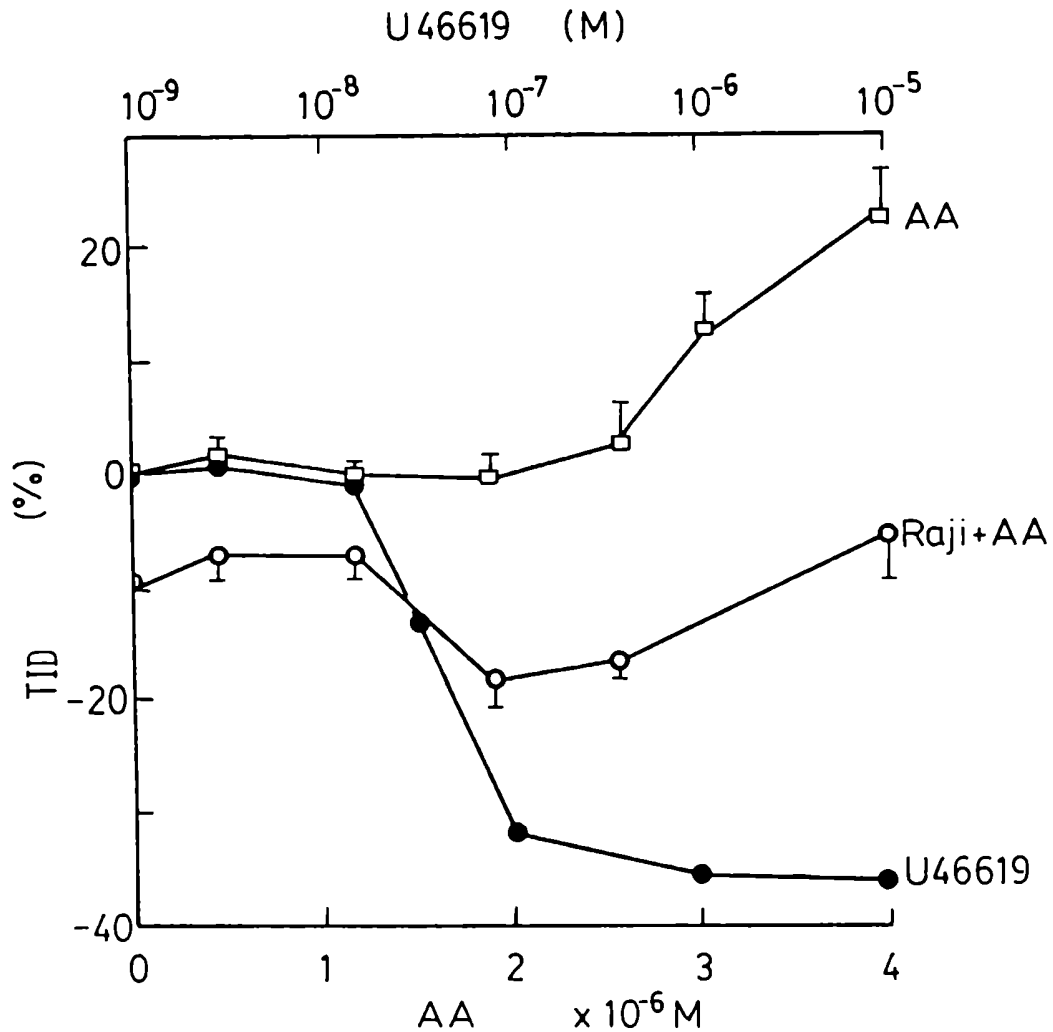
Efecto de células de LLC-B tratadas con un inhibidor de la tromboxano sintetasa (L-8027) sobre la contractilidad cardíaca:



Se enfrentaron a la preparación de aurícula aislada 4×10^4 células de LLC-B incubadas durante 30 minutos a 37°C en 0,5 ml de RPMI o en RPMI con el agregado de L-8027 (10^{-8}M). Se determinaron los cambios porcentuales de los valores iniciales de tensión (TID). Se grafican los datos individuales de las células de 7 pacientes.

FIGURA 20

Efecto de células Raji sobre la contractilidad cardíaca:



Las células Raji fueron cultivadas durante 72 hs a 37°C en RPMI-SFB. 0,5 ml de RPMI conteniendo 4×10^6 células fueron añadidos a la preparación de aurícula de rata latiendo en 15 ml de KRB. Se construyó una curva acumulativa dosis respuesta agregando cantidades crecientes de AA a intervalos de 3 a 5 minutos. Se determinaron las medias aritméticas \pm error estándar de la media de los cambios porcentuales de tensión (TID) de 6 experimentos a los 10 minutos del agregado de las células. Como control se determinó el efecto directo del U-46619 que es un análogo del TXA₂.

TABLA 8

Efecto de células linfoblastoideas sobre la actividad contráctil de la aurícula aislada de rata:

Células Raji		n	TID (%)
RPMI		6	+ 1 ± 1
Tiempo de cultivo:	24 h	8	5 ± 2
	48 h	19	9 ± 1
	72 h	19	- 12 ± 2

Las células Raji se cultivaron durante 24, 48 o 72 horas (h) a 37°C en RPMI-SBF. 4×10^6 células fueron agregadas a la preparación de la aurícula de rata en 15 ml de KRB. Se determinaron las medias aritméticas \pm error estándar de la media de los cambios porcentuales de los valores iniciales de tensión (TID) de n experimentos a los 10 minutos del agregado de las células.

TABLA 9

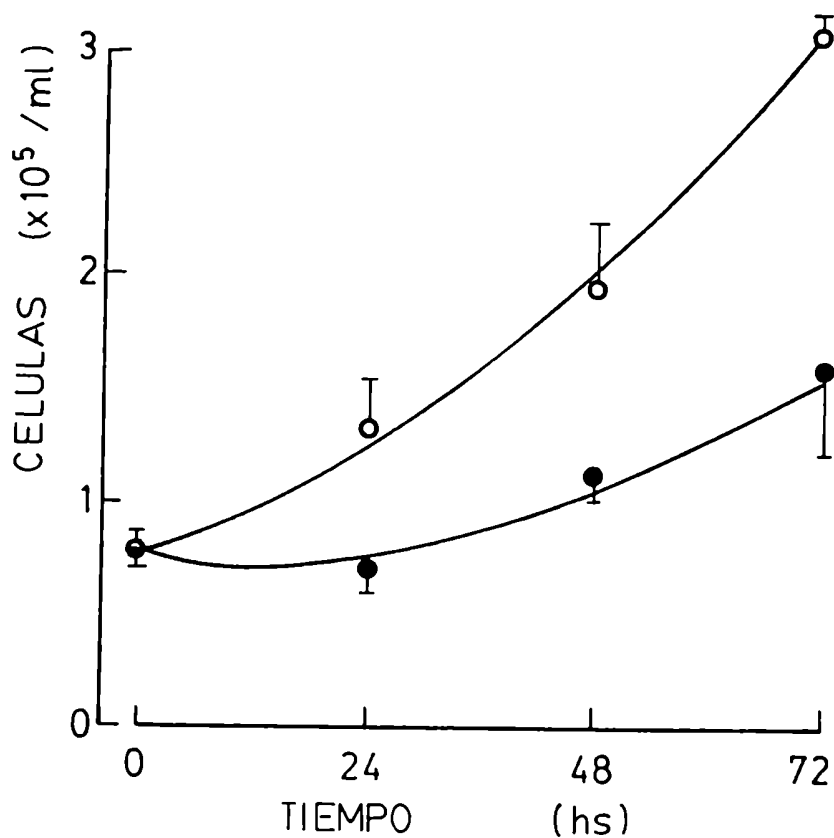
Efecto de células linfoblastoideas Raji tratadas con inhibidores del metabolismo de ácido araquidónico sobre la contractilidad cardíaca:

Raji incubadas con:		TID (%)	
		KRB	KRB + AA
RPMI	13	-11 ± 3	-20 ± 2
Indometacina (10 ⁻⁴ M)	3	0 ± 1	+ 4 ± 6
ASA (8x10 ⁻⁴ M)	6	0 ± 2	+ 8 ± 4
L-8027 (10 ⁻⁵ M)	8	0 ± 3	+ 4 ± 5
Imidazol (10 ⁻⁵ M)	3	- 2 ± 3	+ 4 ± 5

Las células Raji fueron cultivadas durante 72h a 37°C en RPMI-SFB. Las células, en una concentración de 8x10⁶/ml, se incubaron durante 30 minutos a 37°C en RPMI o en RPMI con el agregado de los siguientes inhibidores: indometacina (10⁻⁴M), ASA (8x10⁻⁴M), L-8027 (10⁻⁵M), imidazol (10⁻⁵M). 0,5 ml de la suspensión de células Raji en RPMI o en RPMI en presencia de los inhibidores se agregaron a la preparación de aurícula aislada. Se determinaron los cambios porcentuales de los valores iniciales de tensión (TID) a los 10 minutos y nuevamente 10 minutos después del agregado de AA a una concentración final de 1,98 x 10⁻⁴M. Los inhibidores y el AA a las concentraciones mencionadas no tuvieron efecto sobre los valores de TID basales. Se tabularon las medias aritméticas ± error estándar de n experimentos.

FIGURA 21

Efecto de un inhibidor de la tromboxano sintetasa (L-8027) en el crecimiento de las células Raji:



Las células Raji se cultivaron en 10 ml de medio RPMI-1640, 10% SFB, en una concentración inicial de 1×10^5 células/ml en ausencia (○) y en presencia de L-8027 10^{-8} M (●). Se grafican las medias aritméticas \pm error estándar de la media de los recuentos celulares obtenidos a las 24, 48 y 72 horas de cultivo de 7 experimentos.

TABLA 10

Producción de metabolitos del ácido araquidónico por células Raji y células de LLC-B:

	Radioconversión			RIA		
	n	6-ceto PGF _{1α}	PGE ₂	TxB ₂	n	TxB ₂
		(% de conversión de [1- ¹⁴ C] AA)				(pg/40x10 ⁶ células)
Raji	8	1,05±0,16	0,98±0,14	3,97±0,49	6	136± 39
LLC-B	5	0,39±0,03	0,55±0,11	1,69±0,31	7	749±334

Se efectuaron los ensayos de conversión del [1-¹⁴C] AA en sus metabolitos y de RIA para detectar la producción de TxB₂ de células Raji o de células de pacientes con LLC-B tal como se describe en Materiales y Métodos. Se tabula la media aritmética ± error estándar de la media de n experimentos o de n pacientes con LLC-B.

D I S C U S S I O N

DISCUSION

Para facilitar el desarrollo de la discusión, ésta se dividirá en tres partes correspondientes a los estadios experimentales realizados para resolver los interrogantes planteados inicialmente.

1. Determinación del tipo de linfocitos activados involucrados en la inducción de cambios en la contractilidad cardíaca

La activación temprana de los linfocitos humanos normales por PHA o por el ionóforo de calcio A 23187, les confiere la capacidad de modificar la actividad contráctil de la aurícula aislada de rata (165). Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que los linfocitos activados de progenie T son los responsables del incremento de la tensión y frecuencia cardíaca por un mecanismo que involucra la liberación de la SRS-A, que está constituida por los leucotrienos C₄, D₄ y E₄ (72).

Para lograr una respuesta inmune óptima es necesaria la interacción de varios tipos celulares diferentes. Uno de los niveles de control de la respuesta inmune está dado por la acción de los linfocitos T tanto sobre las células B como sobre otras poblaciones de células T. Además, se ha demostrado que los linfocitos T no sólo favorecen sino que también suprimen respuestas inmunes, ejerciendo una función reguladora importante que abarca un amplio espectro: desde la estimulación total a la supresión total.

Las diversas funciones inmunoregulatorias llevadas a cabo por los linfocitos T son efectuados por distintos clones celulares, que pueden ser diferenciados por sus antígenos de superficie. Por consiguiente los anticuerpos dirigidos contra antígenos de diferenciación son instrumentos muy útiles en la identificación y aislamiento de los distintos subtipos celulares.

Los linfocitos CD4 son los que participan en reacciones de colaboración o inducción de la respuesta inmune mientras que los CD8 están asociados a respuestas supresoras o citotóxicas (5).

Sin embargo investigaciones posteriores acerca de estas subclases de linfocitos han demostrado que considerar solamente estas subdivisiones sería simplificar demasiado la diversidad funcional de los linfocitos T, ya que han surgido evidencias de una heterogeneidad importante en las subpoblaciones de linfocitarias T. Por ejemplo dentro de la población CD4 se ha definido el subgrupo CD4 CD45⁻ que posee propiedades colaboradoras con las células B ya que induce su proliferación y diferenciación a células plasmáticas y otra subpoblación (CD4 CD45R⁺) que actúa como inductora de las células supresoras CD8 (174).

En cuanto a la subpoblación de linfocitos CD8, no posee en ninguna fracción actividad colaboradora. Esta subpoblación contiene a los linfocitos con función supresora CD8 y a los linfocitos efectores citotóxicos que expresan además el antígeno CD28 (175).

Las células supresoras T, regulan la respuesta inmune inhibiendo el crecimiento celular y la diferenciación a células

con actividad inductora de los CD4. Por lo tanto las interacciones entre los CD4 y los CD8 son cruciales para un funcionamiento efectivo del sistema de control negativo de la respuesta inmune.

El delicado equilibrio que existe normalmente entre las respuestas supresoras y colaboradoras mantiene al sistema inmune en un balance homeostático cuya alteración daría origen a múltiples patologías.

Para determinar la participación de las subpoblaciones de linfocitos T activados en la modificación de la respuesta inotrópica y cronotrópica del tejido auricular expuesto a linfocitos T activados se obtuvieron poblaciones enriquecidas en linfocitos con antígeno CD4 o CD8 mediante una lisis selectiva con anticuerpos monoclonales y complemento.

La separación fue eficiente (TABLA 1), y ambas subpoblaciones se comportaron de un modo diferente luego de su activación con PHA. La población celular constituida por los linfocitos CD4 era la responsable del efecto inotrópico y cronotrópico positivo observado (FIGURA 8). Por el contrario la fracción de linfocitos CD8 tenía el efecto opuesto disminuyendo la tensión pero sin alterar sustancialmente la frecuencia contráctil. En consecuencia, el efecto estimulante producido por la preparación total de linfocitos T surge del balance de las contribuciones de las fracciones CD4 y CD8 y su efecto es proporcional al número de células agregadas al sistema (FIGURA 8).

Reinherz y sus colaboradores han demostrado que la respuesta

proliferativa a antígenos solubles está restringida a la fracción CD4 y la magnitud de la respuesta es comparable a la de la población T sin fraccionar, ya que la fracción CD8 virtualmente no responde al antígeno soluble. La magnitud de la respuesta a la PHA también difiere en ambas fracciones. La población CD4 proliferaba óptimamente ante el estímulo mitogénico de la PHA y la respuesta es comparable a la de la población de linfocitos T sin fraccionar (176). Esto nos indica que existe una respuesta proliferativa selectiva de la población CD4 al estímulo de la PHA.

Probablemente la señal dada por la PHA en el sistema descrito por Reinherz no constituye un estímulo suficiente para activar a la subpoblación CD8 hasta la división celular. Sin embargo otros autores observaron que la subpoblación CD8 prolifera en respuesta a la PHA (177). En nuestro sistema, el estímulo de la PHA indujo respuestas en la subpoblación CD8 capaces de modificar el comportamiento auricular.

En un trabajo previo del laboratorio realizado con la población total de células T se sugirió que sólo las etapas más tempranas de la activación mitogénica de los linfocitos T son necesarias para desarrollar el efecto sobre la contractilidad (165).

Estos resultados podrían ser el fruto de interacciones entre ambas subpoblaciones regulatorias T. Sin embargo, el análisis de los datos presentados en la FIGURA 9, demuestra que tanto los efectos estimulantes de los CD4 como los supresores de los CD8

pueden ejercerse a los pocos minutos de agregado del mitógeno a cada población purificada, lo que indica que el efecto es directo, o sea que no necesita la colaboración de la otra subpoblación y tampoco requiere alcanzar las etapas avanzadas de la estimulación linfoidea (división celular) en ninguno de los casos.

Para intentar comprender los mecanismos de acción de los linfocitos activados se emplearon drogas inhibitoras y/o antagonistas con acción farmacológica que permitan discernir los caminos metabólicos involucrados. Se probó el efecto del FPL-55712, que es un antagonista de la SRS-A sobre la reacción entre la subpoblación CD4 estimulada con PHA y la aurícula de rata. El efecto estimulante se bloqueó, (TABLA 3), sugiriendo que los leucotrienos (C₄, D₄ y/o E₄) serían los responsables de los cambios de tensión y frecuencia de las contracciones. También se ha demostrado que el FPL-55712 antagoniza la acción de la SRS-A en la traquea de cobayo (178) y en las vías aéreas respiratorias humanas (179). Los leucotrienos y otros productos de lipoxigenasas alteran intensamente la función cardíaca de la mayoría de las especies estudiadas (180). Asimismo, el tejido cardíaco produce cantidades significativas de leucotrienos cuando se lo expone ya sea a estímulos inmunológicos como no inmunológicos (181).

Los leucotrienos C₄ y D₄ son capaces de actuar sobre el corazón aislado de cobayo produciendo un efecto inotrópico positivo (182). Otros autores (183) empleando el órgano entero y estudiando el efecto de distintas clases de leucotrienos por

perfusión, encontraron efectos depresores de la contractilidad cardíaca. En este caso la disminución de la tensión contráctil del miocardio, fue consecuencia de la disminución del flujo coronario, ya que el efecto predominante de los leucotrienos en este sistema fue la vasoconstricción. Aún no está aclarado si la alteración de la actividad contráctil cardíaca es debida únicamente a la insuficiencia coronaria e isquemia cardíaca, o si el LTD₄ también tiene un efecto inotrópico negativo en el miocardio independientemente del efecto vascular (184). Como la indometacina inhibe parcialmente las acciones depresoras del LTC₄ y del LTD₄ sobre el corazón perfundido de cobayo, se ha sugerido una posible participación del TxA₂ (69). Las diferencias entre los resultados podrían estar relacionados a los modelos experimentales utilizados en cada caso.

En nuestro sistema, el efecto también se bloqueó con el agregado de NDGA 10^{-5} M (datos no mostrados), que a la concentración indicada inhibe la generación de metabolitos del AA por la vía de las lipoxigenasas al igual que la generación de SRS-A. En cambio cuando se utilizó la indometacina, que en una concentración 10^{-6} M es un inhibidor de la ciclooxigenasa, se observó una exacerbación del efecto positivo (TABLA 3). Esto último se debería a una mayor disponibilidad de AA que podría ser metabolizado por lipoxigenasas o también podría deberse a la desaparición de productos derivados de la vía enzimática de las ciclooxigenasas con propiedades inotrópicas negativas. En efecto, se ha demostrado que la prostaglandina E tiene un efecto inotrópico

negativo sin alterar la frecuencia de contracciones de la aurícula aislada de rata (185). Por otro lado, nuestros resultados demuestran que el uso de indometacina 10^{-6} M no afecta la respuesta del tejido auricular en presencia de la subpoblación CD8 estimulada con PHA (TABLA 3). Los mecanismos a través de los cuales los linfocitos CD8 activados deprimen la actividad contractil de la aurícula no están claros aún.

Aparentemente el sistema experimental empleado no es suficiente para dar una orientación acerca de las vías metabólicas involucradas en este caso. En cambio, si bien la evidencia es indirecta, los resultados obtenidos con el uso de inhibidores y/o antagonistas sugieren que la acción de los linfocitos CD4 activados involucra la biosíntesis de derivados del metabolismo oxidativo del AA, especialmente los de la vía de la lipoxigenasa.

Como los inhibidores del metabolismo del AA estaban presentes a lo largo de toda la reacción conjuntamente con las subpoblaciones de linfocitos T, la PHA y la aurícula aislada de rata, no era posible discernir si los metabolitos activos eran un producto de las células efectoras estimuladas o si derivaban del tejido auricular durante la fase final del bioensayo. En consecuencia, la reacción se dividió en dos etapas: en la primera etapa se incubaron las células efectoras con PHA durante 30 minutos a 37°C y se obtuvieron los sobrenadantes libres de células, y en una segunda etapa se efectuó el bioensayo con los sobrenadantes obtenidos en la primera etapa, en ausencia y en

presencia de inhibidores del metabolismo del AA. Este procedimiento sirvió para demostrar que los sobrenadantes de linfocitos T activados con PHA por un período corto de tiempo (30 minutos) ejercían sobre el tejido auricular el mismo efecto que las células intactas; revelando así que la acción de los linfocitos activados sobre la aurícula involucraría a factores solubles liberados al sobrenadante de la reacción (TABLA 4).

Cuando el sobrenadante de la subpoblación CD4 activada con PHA se enfrentó con el tejido auricular preincubado con FPL-55712, el efecto inotrópico y cronotrópico desapareció (FIGURA 10). La contribución hipotética de metabolitos del AA por parte de los linfocitos sería despreciable ya que luego de la preincubación de la aurícula con NDGA en una concentración que interfiere con la acción de las lipoxigenasas, ésta no responde a los sobrenadantes de linfocitos CD4 activados con PHA (FIGURA 10). De tal manera se confirma que la respuesta cronotrópica e inotrópica positiva a los sobrenadantes activos está mediada por los leucotrienos C₄, D₄ y E₄ provenientes de la aurícula.

Se ha comprobado fehacientemente que los linfocitos humanos normales, deplecionados de neutrófilos, monocitos y plaquetas liberan AA cuando son estimulados (90,171,186). Sin embargo la evidencia de la producción de leucotrienos por las células T es muy controvertida. Goldyne y sus colaboradores no han detectado síntesis de metabolitos del AA por células T humanas en cultivos deplecionados de monocitos (116). Otros autores, por el contrario, le han atribuido a los linfocitos T humanos la generación

de productos derivados del metabolismo del AA por acción de la lipoxigenasa, pero las determinaciones fueron efectuadas en poblaciones de linfocitos contaminadas con células no identificadas (137,187). Aunque los resultados obtenidos hasta este momento, involucrarían preferentemente a los monocitos como generadores de eicosanoides; no se excluye la posibilidad de que los leucotrienos sean producidos por linfocitos: a) en concentraciones muy bajas no detectables por los métodos analíticos actualmente disponibles o b) como respuesta a señales estimulatorias aún no probadas experimentalmente.

Hemos demostrado entonces, que los linfocitos CD4 activados pueden modificar el comportamiento contráctil de la aurícula aislada de rata a través de factores solubles. Estos factores son capaces de activar la acción de las lipoxigenasas del tejido auricular generando los leucotrienos, que serían los responsables de los efectos inotrópicos y cronotrópicos observados. La naturaleza de los factores solubles liberados por los linfocitos CD4 activados debe aún ser dilucidada.

2. Papel del ácido araquidónico en la estimulación cardíaca provocada por linfocitos humanos normales

En esta etapa intentamos discernir si la calidad de la respuesta provocada por los linfocitos activados dependía de la clase de células linfoides involucradas o del estímulo desencadenante. Por ejemplo, si la capacidad de provocar efectos inotró-

picos positivos fuera propia sólo de los linfocitos CD4 y los efectos inotrópicos negativos de los CD8 y de los no T (165) aún cambiando el estímulo, las diferentes clases de células darían respuestas semejantes a las halladas para las poblaciones estimuladas con PHA.

La unión de lectinas mitogénicas a la superficie del linfocito induce una serie de eventos bioquímicos que conducen a la activación celular. Una de las consecuencias más tempranas de dicha estimulación es la movilización de los lípidos de la membrana con un aumento de la disponibilidad de AA (172). Este ácido graso puede provocar cambios en la contractilidad cardíaca por sí mismo o a través de sus metabolitos. Se ha descrito un efecto cronotrópico positivo del AA sobre la aurícula aislada de cobayo atribuible a peróxidos producidos durante su metabolismo (188). También se ha demostrado que la administración de AA por perfusión produce, como consecuencia de su biotransformación a metabolitos activos, respuestas bifásicas en la aurícula aislada de rata (189).

Como la liberación de AA es un paso común en el proceso de activación de todas las subpoblaciones linfocitarias empleando distintos estímulos, decidimos aportar AA exógeno a linfocitos totales o subpoblaciones linfocitarias no estimuladas con mitógenos y analizar la calidad de la respuesta obtenida empleando la aurícula aislada de rata como bioensayo.

En la segunda parte de esta tesis quisimos averiguar si el agregado de AA en concentraciones bajas, incapaces de alterar por

si mismas el funcionamiento cardíaco, podía desencadenar la reacción entre los linfocitos humanos normales y la aurícula aislada de rata. De este modo se prescindiría de la etapa inicial del proceso de activación celular inducida por la PHA, y el AA actuaría como sustrato para los pasos siguientes de la cascada de estimulación.

Se han realizado numerosos estudios tendientes a describir la acción regulatoria de los metabolitos del AA sobre un amplio espectro de respuestas del sistema inmune pero las evidencias de la acción directa del AA sobre las células de dicho sistema son muy escasas.

Aparentemente, la activación de la fosfolipasa A_2 , que cataliza la liberación del AA de los fosfolípidos, tendría un papel muy importante en los mecanismos de transducción de la señal que tienen lugar luego de la interacción del ligando con su receptor. Estudios realizados en la línea EL-4 (derivada de un timoma murino) demostraron que la IL-1 activa a la fosfolipasa A_2 . Asimismo el agregado exógeno de esta fosfolipasa o de AA reemplaza el requerimiento de la IL-1 para la producción de IL-2 por estas células (190).

Johnson y sus colaboradores han realizado una serie de experimentos utilizando un modelo de esplenocitos murinos deplecionados de la población T colaboradora. Ellos demostraron que el AA fue capaz de reemplazar una señal necesaria para la producción de IFN- γ . Aún más, estos autores comprobaron que el AA era más efectivo que el LTC₄, el 5-HETE o el 15 HETE, ya que una

concentración de 3nM restauró completamente la capacidad de producción de IFN γ (135). Los mismos resultados se obtienen con el agregado de PLA₂ a este sistema, comprobándose así que el efecto observado es debido a la liberación de AA endógeno (191). Se ha descrito que el AA y/o sus metabolitos de lipoxidación activarían a la guanilato ciclasa. Por ende, muchos de los efectos biológicos del AA podrían deberse a la inducción de aumentos en el contenido de GMPc (117).

Recientemente varios autores han documentado que el AA actuaría en células fagocíticas, como segundo mensajero en la producción de especies reactivas del oxígeno ante una variedad de estímulos. Mc Phail y sus colaboradores sugirieron que el AA actuaría a través de la activación de la proteína quinasa C (192), mientras que otros grupos de investigadores sostienen que el AA activaría directamente al sistema generador de O₂⁻, la NADPH oxidasa (193,194). También está descrito, que un aumento de ácidos grasos insaturados en la membrana celular trae aparejado cambios en sus propiedades físicas (fluidez, potencial eléctrico, transporte de solutos y otras alteraciones) (195) que podrían afectar secundariamente la actividad de la NADPH oxidasa en macrófagos y leucocitos polimorfonucleares.

Nuestros experimentos demuestran que los linfocitos humanos normales son capaces de aumentar la respuesta del tejido auricular al AA libre. Concentraciones de AA entre 8×10^{-7} y 2×10^{-6} M, inactivas per se, dan marcados cambios positivos en la tensión contráctil en presencia de los linfocitos. Además, la

frecuencia de las contracciones, que no es modificada por el AA aún en concentraciones elevadas, también aumentaba cuando éste se agregaba junto con los linfocitos (FIGURA 11), o sea que la respuesta de la aurícula cambió cualitativamente y cuantitativamente por acción del AA y los linfocitos.

Al igual que con los linfocitos estimulados con PHA, los cambios en los parámetros contráctiles se observaron poco tiempo después del agregado de los linfocitos tratados con AA. Por lo tanto, se deduce que sólo las primeras etapas de activación linfocitaria estarían involucradas en este proceso (FIGURA 11). La reacción estaría mediada por metabolitos oxidativos del AA provenientes de la vía de las lipoxigenasas ya que el pretratamiento de la aurícula con inhibidores de esta vía metabólica, anuló los efectos tanto inotrópicos como cronotrópicos. Por el contrario, la preincubación de la aurícula con inhibidores de la vía de la ciclooxigenasa, no eliminó la reacción inotrópica positiva de los linfocitos en presencia de AA en concentraciones subumbrales (FIGURA 12).

El efecto del agregado de AA solo, en un rango de concentraciones de $2 \times 10^{-6}M$ a $10^{-5}M$ sobre la aurícula aislada de rata es distinto al observado en presencia de linfocitos y cantidades subóptimas de AA (FIGURAS 13 y 14). En esta zona de la curva dosis-respuesta, los linfocitos también exacerban la respuesta de la aurícula al AA. Este efecto difiere tanto en magnitud como en el origen de los productos que lo inducen ya que en este caso el mecanismo de acción involucra a derivados de la vía de la ciclo-

oxigenasa. Estos resultados son confirmados por experimentos que demuestran que la inhibición de esta vía por ASA e indometacina anula el efecto biológico, mientras que el NDGA en concentraciones que no afectan la vía de la ciclooxigenasa no inhibe la reacción (FIGURA 14).

En consecuencia, según la dosis de AA suministrada, los linfocitos conjuntamente con el AA inducen una respuesta inotrópica y cronotrópica positiva por diferentes mecanismos. A bajas dosis de AA los metabolitos involucrados en el efecto inotrópico y cronotrópico positivo son los leucotrienos, debido a que el efecto desaparece cuando la aurícula es preincubada con FPL-55712 (FIGURA 15). A altas dosis de AA, los linfocitos potencian el efecto inotrópico a través de mecanismos que involucran ambas vías del metabolismo del AA (tanto la vía de la ciclooxigenasa como la de la lipoxigenasa) (FIGURA 15).

En estas condiciones, la inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa impide parcialmente el efecto inotrópico positivo de los linfocitos tratados con AA. Solamente por preincubación de la aurícula con FPL-55712 en conjunto con ASA se consiguió eliminar el efecto inotrópico estimulador de los linfocitos tratados con AA. Por otro lado la preincubación de la aurícula con FPL-55712 fue suficiente para bloquear el efecto cronotrópico positivo (FIGURA 15). Las reacciones involucran un balance entre los productos derivados de la ciclooxigenasa y de la lipoxigenasa con un papel central para la SRS-A.

Dos aspectos de la reacción merecen ser enfatizados: la

aparición de un efecto cronotrópico que se observa solamente cuando los linfocitos son agregados a la preparación junto con el AA y la sensibilización de la reacción de la aurícula a los efectos del AA. Estos efectos se hacían igualmente evidentes tanto con el agregado de la mezcla de linfocitos preincubados con AA a la aurícula como con el agregado de linfocitos solos a la aurícula seguido de cantidades crecientes de AA (curva dosis-respuesta) (FIGURAS 11 y 15).

En otros sistemas también se han descrito fenómenos de activación inducidos por AA en altas concentraciones. El tratamiento de las plaquetas con activadores fisiológicos tales como la trombina, el colágeno, el factor activador de las plaquetas y el AA conduce a una serie de respuestas incluyendo el cambio de forma, la liberación del contenido de gránulos densos y alfa y la agregación (196). Estas respuestas están asociadas a la activación de fosfolipasas específicas y a la aparición de derivados lipídicos activos. El AA ($10^{-3}M$) incorporado a un plasma rico en plaquetas necesita ser metabolizado por la ciclooxigenasa a endoperóxido y posteriormente a tromboxano para inducir la respuesta de agregación plaquetaria (81). Asimismo, se libera ADP de los gránulos densos. El AA también induce la agregación de leucocitos polimorfonucleares a través de intermediarios activos provenientes de la vía metabólica de las lipoxigenasas (119). Otros autores describen un efecto de agregación inducido por AA y LTB₄ en una población de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana (197). Contrariamente, en un trabajo efectuado

en colaboración, nosotros hemos observado que entre varios agentes agregantes empleados, sólo el AA fue capaz de inducir la agregación de células mononucleares de sangre periférica humana. La vía enzimática involucrada fue la de la ciclooxigenasa. Los LTB₄, LTC₄, LTD₄ no fueron capaces de inducir la agregación en este sistema (198).

Los resultados de los estudios llevados a cabo por varios grupos de investigadores coinciden al sostener que el AA suministrado exógenamente se metaboliza preferentemente a productos de ciclooxigenasa, mientras que los leucotrienos predominan sobre los metabolitos de ciclooxigenasa cuando el ácido graso endógeno es movilizado por un agonista. Estas diferencias han sido descritas en macrófagos alveolares y en neutrófilos y células mononucleares de sangre periférica humana.

Humes y colaboradores observaron que la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas estaban bajo un control independiente en macrófagos peritoneales murinos. En ese momento argumentaban que el AA estaba esterificado en distintos compartimentos intracelulares de fosfolípidos, de manera tal que las diferencias en los perfiles metabólicos podrían explicarse por la accesibilidad del AA para ser sometido a la acción de una u otra enzima dependiendo del agonista empleado como estímulo (199).

Sin embargo los estudios actuales que demuestran la existencia de una acción sinérgica de agentes que activan a la PKC y otros que elevan el Ca²⁺ intracelular, presentan una explicación alternativa para esta regulación independiente. Por ejemplo la

acción sinérgica del PMA y el A 23187 induce la liberación de AA en neutrófilos humanos aumentando la disponibilidad de sustrato para la producción de LTB₄, a través de un mecanismo que involucra la activación de la PKC (200). Esto mismo ha sido sugerido en un estudio en plaquetas humanas, en donde se observó que el PMA y los diacilglicéridos provocaban un aumento de la liberación de AA inducido por A 23187 (201).

En un trabajo reciente, Humes comprueba (202) que es necesaria la acción sinérgica del ionóforo de Ca²⁺ y el PMA para inducir la síntesis de LTC₄ en macrófagos peritoneales murinos. Contrariamente, la síntesis de PGE₂ requiere solamente la activación de la PKC, ya que el PMA solo (sin el agregado de otro cofactor) es capaz de estimular completamente su síntesis. En relación a esto se sabe que la 5-lipoxigenasa requiere Ca²⁺ para su activación, en tanto que contrariamente la actividad de la ciclooxigenasa no es afectada por el Ca²⁺ (203).

El efecto provocado por la población total de linfocitos de sangre periférica humana sobre la respuesta de la aurícula al AA, sería el resultado de la contribución de las diferentes clases y subpoblaciones de linfocitos. Nosotros demostramos que tanto la población enriquecida en linfocitos T como la enriquecida en linfocitos no T (en reposo), potenciaban el efecto inotrópico positivo del AA (FIGURA 16).

En un trabajo previo se demostró (165) que la población de células no T activada con PHA ejercía un efecto inotrópico y cronotrópico negativo, pero el comportamiento de esta fracción

celular es muy difícil de evaluar debido a su heterogeneidad (linfocitos B, K, monocitos).

Asimismo comprobamos que dentro de la población T, ambas subpoblaciones CD4 y CD8 ejercían un efecto inotrópico positivo en presencia de AA (FIGURA 17). Por lo tanto, cuando el AA interacciona inespecíficamente con la membrana linfocitaria se pierde la selectividad del efecto (inotrópico positivo o negativo) descrito previamente para subpoblaciones linfocitarias definidas activadas por la PHA.

Los resultados obtenidos con los sobrenadantes libres de células de linfocitos totales tratados con AA, demuestran que se generan factores solubles capaces de desencadenar efectos inotrópicos y cronotrópicos sobre la aurícula de rata (TABLA 5). Los sobrenadantes obtenidos de subpoblaciones no T, CD4 y CD8 incubados con AA también ejercían un efecto inotrópico positivo sobre la aurícula aislada de rata (TABLA 6). Por lo tanto no es necesario el contacto directo de las células con el tejido cardíaco para producir el aumento de la actividad contráctil.

La inhibición de las lipoxigenasas de la aurícula o el bloqueo de los receptores de la SRS-A impidió la acción de factores solubles sobre la aurícula (TABLA 5); esto sugiere que los metabolitos oxidativos del AA se producen mediante la batería enzimática de la aurícula, siendo los leucotrienos los metabolitos más importantes involucrados en el efecto.

De acuerdo a nuestros resultados se puede postular que el AA reemplazaría al estímulo linfocitario temprano dado por la PHA

induciendo la liberación de factores solubles al sobrenadante, los cuales a su vez modificarían la tensión y frecuencia cardíacas.

Paralelamente quisimos determinar, si el AA utilizado en las condiciones experimentales del bioensayo ejercía un efecto modulador sobre la proliferación linfocitaria. Comprobamos que el agregado exógeno de AA $10^{-7}M$ a un cultivo de linfocitos humanos normales no tuvo efecto per se ni potenció la acción mitogénica de la PHA (TABLA 7). Kelly y Parker (204) describieron que el AA provocaba un aumento de la incorporación de timidina tritiada en cultivos de linfocitos estimulados con PHA. Este resultado está en discrepancia con el obtenido por nosotros probablemente por diferencias en las condiciones experimentales (pureza de la suspensión linfocitaria) ya que estos autores utilizaron sangre heparinizada lo que implica contaminación plaquetaria. En cuanto a la exploración del efecto de dosis mayores de AA en el sistema de la aurícula aislada, una concentración elevada de AA provocaría el estímulo de la ciclooxigenasa de la aurícula (FIGURA 15) por lo que no analizamos su acción en los ensayos de proliferación.

En otras palabras, nosotros sugerimos que la presentación de AA a la aurícula en asociación con factores solubles derivados de los linfocitos, ofrecen una señal al tejido cardíaco que difiere de la señal dada por el AA solo. Es decir que las células linfocíticas activadas liberarían AA y otros productos solubles al medio, que en forma sinérgica podrían afectar al comportamiento

cardíaco. Esta situación podría ser similar a la comentada en párrafos anteriores de esta discusión, donde se describen fenómenos de activación celular inducidos por 2 o más agonistas en forma sinérgica en macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y plaquetas.

Nuestros experimentos se aproximan más a condiciones que pueden observarse in vivo ya que fisiológicamente la concentración de AA libre es de 10^{-7} M (188). En cambio la mayor parte de los estudios realizados in vitro son forzados pues se utilizan concentraciones de AA muy elevadas, capaces de dar efectos inespecíficos e improbables de obtener en reacciones biológicas.

3. Efectos de linfocitos transformados sobre la contractilidad cardíaca

Finalmente quisimos determinar si la capacidad de los linfocitos para sensibilizar la respuesta de la aurícula al AA era una propiedad general de los linfocitos o si dependía de su grado de diferenciación o transformación. Con tal motivo, se procedió a investigar si los linfocitos neoplásicos de la LLC y las células linfoblastoideas de la línea celular Raji podrían utilizar al AA del mismo modo que los linfocitos normales.

Se sabe que los métodos convencionales de fraccionamiento son técnicas de enriquecimiento en una determinada población, pero siempre existe contaminación por otros tipos celulares, que aún en mínima proporción puede influir sustancialmente en un

fenómeno biológico. Este inconveniente es aún más acentuado cuando se trata de la población no T ya que una de sus características es la de ser muy heterogénea. Este fue otro motivo que nos indujo a la utilización de una línea celular o de células provenientes de pacientes con leucemia linfática crónica (LLC) con masiva predominancia de células neoplásicas en sangre periférica.

Previamente probamos el efecto directo de las células de LLC-B, LLC-T y Raji sobre la aurícula en ausencia de AA exógeno y observamos que contrariamente a los linfocitos normales T y no T, las células de 10 de los 14 casos de LLC-B, las células de los 2 casos de LLC-T estudiados y las Raji disminuyeron la tensión contráctil (FIGURA 18, TABLA 8). En el caso de las Raji que son células en división continua, este efecto negativo aumentó con el tiempo de cultivo (TABLA 8) y con el agregado de AA exógeno en una concentración de 2×10^{-6} M (FIGURA 20), (probablemente debido a una mayor producción de sustancias activas).

El efecto inotrópico negativo de las células Raji en presencia de AA era comparable al efecto del U-46619 (10^{-7} M) (FIGURA 20), que es el análogo sintético del endoperóxido y mimetiza la acción del TxA_2 (173).

Con el objeto de determinar el papel de la producción de Txs por las células linfoblastoideas, preincubamos a las células Raji con inhibidores de la vía de la ciclooxigenasa (indometacina y ASA) y con inhibidores de la síntesis de Txs (L-8027 e imidazol). Los resultados obtenidos sugieren que los Txs estarían involucra-

dos en el efecto inotrópico negativo de las células Raji (TABLA 9). El efecto inotrópico negativo de los linfocitos leucémicos-también se revirtió cuando las células fueron pretratadas con L-8027 (FIGURA 19). Los sobrenadantes libres de células eran inactivos, hecho que era compatible con la corta vida media de los metabolitos activos.

Otra evidencia indirecta de la producción de Tx por las células Raji fue la inhibición de su crecimiento celular en presencia de L-8027 (FIGURA 21). Probablemente las células Raji tendrían caminos metabólicos capaces de ser regulados positivamente por los Txs.

Las prostaglandinas y otros derivados del metabolismo del AA están involucrados en la regulación de la proliferación y diferenciación celular en un gran número de sistemas pero los resultados informados por diversos autores son contradictorios. Se ha demostrado que inhibidores de la 5-lipoxigenasa ejercen poderosos efectos antiproliferativos en las líneas leucémicas K562 (eritroleucemia humana), Molt 4B (leucemia linfóide T) y HL 60 (leucemia pro-mielocítica) (205). Por otro lado, los inhibidores de la síntesis de PGs pueden reducir el tamaño de algunos tumores (generalmente tumores sólidos) (206). Sin embargo también se ha descrito que las PGs inhiben la proliferación de células en cultivo (207,208). Estas discrepancias podrían deberse a diferencias en las condiciones experimentales. Aún más importante, diferentes concentraciones de PGE₂ pueden respectivamente estimular o inhibir la proliferación

celular (206).

Con el objeto de obtener una evidencia directa de la síntesis de Tx por las células transformadas, se incubaron las células Raji y las de pacientes con LLC-B con AA. Los resultados de radioconversión demuestran que tanto las células Raji como las células de LLC-B pueden metabolizar el AA por la vía de la ciclooxigenasa, siendo el TxB_2 el producto final que se encuentra en mayor concentración (TABLA 10).

Asimismo se confirmó por la técnica de RIA, que en ausencia de AA exógeno tanto las Raji como las LLC-B, eran capaces de generar TxB_2 , que es el metabolito estable derivado del TxA_2 (TABLA 10). Por lo tanto es probable que el efecto inotrópico de las Raji y LLC sea el resultado de la producción de TxA_2 por las células transformadas durante el bioensayo.

Varias células tumorales producen metabolitos del AA incluyendo productos que son activos sobre el sistema hemostático (TxA_2 , PGI_2 y PGD_2) (209,210). Las interacciones entre las células tumorales y los componentes del sistema sanguíneo como factores de coagulación, plaquetas y pared vascular (balance entre TxA_2/PGI_2), juegan un papel muy importante en la diseminación de la metástasis, evitando la formación del trombo (plaqueta-célula tumoral) inducido por el TxA_2 . Se ha sugerido que la PGI_2 o agentes que pueden aumentar la producción de PGI_2 endógena pueden actuar como agentes antimetastáticos (211).

La producción de Txs por linfocitos normales estimulados por PHA, en contraste con las de las células en reposo, ha sido

demostrada por determinación directa de TxB_2 , pero su rol en la regulación de la división celular no está claro (110).

Se han efectuado estudios que han demostrado que la activación celular es un proceso importante en la inducción de la biosíntesis de Txs. Estas determinaciones se han llevado a cabo en las líneas celulares HL-60, Jurkat (leucemia T humana) y A 549 (adenocarcinoma de pulmón humano) (212,213,214).

Muchas de las evidencias obtenidas hasta el momento sobre el papel regulatorio de metabolitos del AA sobre la división celular son indirectas ya que surgen del uso de inhibidores del metabolismo del AA. La interpretación de los resultados ha sido difícil debido a la heterogeneidad de las poblaciones celulares estudiadas por estos autores y a la variedad de efectos laterales de los inhibidores de acuerdo a la clase de células que componen las poblaciones estudiadas (110,111).

Con nuestros resultados comprobamos, respondiendo a nuestra pregunta inicial, que en este sistema experimental las células transformadas y neoplásicas presentan un comportamiento totalmente diferente al observado con las células normales ya que no necesitan de la presencia del AA para ejercer el efecto inotrópico negativo (FIGURA 18, TABLA 8).

Además demostramos que las células linfoblastoideas de la línea celular Raji producen Txs tanto partir del AA endógeno como del exógeno. También las células de LLC-B y probablemente algunas LLC-T son capaces de sintetizar Txs. Por consiguiente la capacidad de producir Txs estaría relacionado con la transforma-

ción y proliferación celular.

Una sobreproducción de Txs por los linfocitos neoplásicos podría ser la causa de complicaciones colaterales de la enfermedad ya estos metabolitos del AA tienen múltiples efectos biológicos en diferentes tejidos.

C O N C L U S I O N E S

CONCLUSIONES

1. Las diferentes subpoblaciones reguladoras de linfocitos T estimuladas con PHA modifican la tensión y frecuencia de las contracciones en la preparación de aurícula aislada de rata latiendo espontáneamente.

I. la fracción CD4 tiene efecto inotrópico y cronotrópico positivo.

II. la fracción CD8 deprime la tensión contráctil.

III. la reacción biológica está vinculada a etapas tempranas de la activación linfoidea, es decir a estadios que preceden la división celular.

IV. el efecto funcional de los linfocitos activados se ejerce, por lo menos en parte, a través de productos solubles que son liberados al sobrenadante de la reacción.

V. el mecanismo de acción de los linfocitos activados o de sus productos derivados involucra la generación de metabolitos oxidativos del AA, predominantemente a través de la vía de la lipoxigenasa, y requiere el sistema enzimático del tejido cardíaco.

2. Los linfocitos humanos normales en reposo conjuntamente con el AA inducen un incremento de la tensión y frecuencia cardíacas.

- I. en presencia de los linfocitos:
 - a) la curva dosis-respuesta del AA se desplaza hacia la izquierda, lo que significa que los linfocitos aumentan la potencia y eficiencia de la droga.
 - b) se observa además una acción cronotrópica positiva del AA.
- II. las primeras etapas de activación linfocitaria estarían involucradas en este proceso.
- III. el mecanismo de inducción de la respuesta inotrópica y cronotrópica positiva depende de la dosis de AA suministrada:
 - a) a baja dosis de AA los metabolitos involucrados son los leucotrienos.
 - b) a altas dosis de AA las reacciones involucran un balance entre los productos derivados de la acción de la ciclooxigenasa y de la lipoxigenasa, con un papel central para la SRS-A.
- IV. tanto los linfocitos T como los linfocitos no T ejercen un efecto inotrópico positivo en presencia de AA; dentro de la población T son igualmente activos los CD4 como los CD8 positivos.
- V. el contacto directo de los linfocitos y el AA con el tejido auricular no es necesario, ya que los sobrenadantes libres de células expuestas al AA, aumentan la tensión y frecuencia cardíacas.
- VI. el AA ($10^{-7}M$) no bastó per se como señal proliferativa ni modificó la respuesta linfocitaria a la PHA.

3. Los linfocitos transformados de pacientes con LLC y las células de la línea linfoblastoidea Raji deprimen la tensión contráctil de la preparación auricular, en ausencia de AA.

- I. en presencia de AA exógeno, las células Raji acentúan el efecto inotrópico negativo.
- II. el efecto es comparable al del U-46619 (análogo sintético del endoperóxido) $10^{-7}M$.
- III. tanto los sobrenadantes de células de LLC como los de Raji son inactivos.
- IV. el efecto estaría mediado por Txs.

R E S U M E N

RESUMEN

La activación temprana de los linfocitos T humanos por PHA, les confiere la capacidad de modificar la actividad contráctil de la aurícula aislada de rata. Los efectos estimulantes de la población linfocitaria T se deben a la contribución de los linfocitos CD4 y son mediados por factores solubles que desencadenan la liberación de SRS-A del miocardio.

Como en el proceso de activación linfocitaria con lectinas aumenta la disponibilidad de AA libre, se estudió la acción de los linfocitos humanos normales expuestos al AA sobre la actividad espontánea contráctil de la aurícula de rata, prescindiendo de este modo de la etapa de estimulación por PHA. Tanto las subpoblaciones linfoideas T, como no T, CD4 y CD8 en presencia de AA, reaccionan in vitro con el miocardio aislado desviando el metabolismo del AA hacia la vía de la lipoxigenasa. Así, los efectos inotrópicos y cronotrópicos observados estarían relacionados con la generación de la SRS-A.

Por último se comprobó que las células de pacientes con LLC o células linfoblastoideas B (Raji), ejercen en ausencia de AA un efecto depresor sobre la tensión contráctil. Evidencias directas e indirectas sugieren que la producción de Txs por estas células transformadas podrían estar involucrados en la respuesta inotrópica negativa, así como podrían intervenir en la regulación de su proliferación.

Marta R. Fumaz

Antares

A B R E V I A T U R A S

ABREVIATURAS

PHA: fitohemaglutinina

LPS: lipopolisacárido

PWM: lectina del pokeweed

PMA: ácido forbol mirístico

AA: araquidonato de sodio/ácido araquidónico

AA*: [1-¹⁴C] araquidonato de sodio

RIA: radioinmunoanálisis

LO: lipoxigenasa

CO: ciclooxigenasa

LT: leucotrieno

SRS-A: sustancia de reacción lenta de la anafilaxia

PG: prostaglandina

Tx: tromboxano

Lx: lipoxina

PL: fosfolipasa

HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico

HPETE: ácido hidroperoxieicosatetraenoico

IL: interleuquina

IFN: interferón

BCGF: factor de crecimiento para células B

BCDF: factor de diferenciación para células B

Ig: inmunoglobulina

Ag: antígeno

C: complemento

CD: cluster de diferenciación
CMH: complejo mayor de histocompatibilidad
L: linfocitos periféricos de dadores normales
LLC: leucemia linfática crónica
Raji: línea celular linfoblastoidea B
T: linfocitos formadores de rosetas E
no T: linfocitos no formadores de rosetas E
rosetas E: linfocitos con 3 o más eritrocitos de carnero adheridos a su membrana
Tc: linfocito T citotóxico
Th: linfocito T colaborador
Ts: linfocito T supresor
linfocito CD4: linfocito de fenotipo CD4⁺
linfocito CD8; linfocito de fenotipo CD8⁺
PI: fosfatidil inositol
PIP₂: fosfatidil inositol difosfato
IP₃: inositol trifosfato
IP₄: inositol tetraquifosfato
PA: ácido fosfatídico
PKC: proteína quinasa C
DAG: diacilglicérido
GMPc: 3', 5' monofosfato cíclico de guanosina
AMPc: 3', 5' monofosfato cíclico de adenosina
ATP: Trifosfato de adenosina
SN: sobrenadante
ETYA: ácido 5,8,11,14-eicosatrienoico

NDGA: ácido nordihidroguayarético

ASA: ácido acetil salicílico

TID: tensión isométrica desarrollada

FC: frecuencia de contracciones.

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA

1. Durum S.K, Schmidt J.A., Oppenheim J.J.
Interleukin 1: an immunological perspective. *Ann. Rev. Immunol.* 3: 263, 1985.
2. Watson J., Barton-Frank M., Nochizuki D., Gillis S.
The biochemistry and biology of IL-2. En "Lymphokines 6", Mizel S.B. ed., 1982, p.95.
3. Reinherz E.L., Penta A.C., Hussey R.E., Schlossman S.F.
A rapid method for separating functionally intact Human T lymphocytes with monoclonal antibodies. *Clin. Immunol. Immunopath.* 21: 257, 1981.
4. Knowles R.W.
Immunochemical analysis of the T cell specific antigens. En "Leukocyte Typing II" Vol 1, Reinherz E.L., Haynes B F., Nadler L.M., Bernstein I.D. eds., Springer-Verlag, New York, 1986, p.259.
5. Romain P.L., Schlossman S.F.
Human T lymphocyte subsets. Functional heterogeneity and surface recognition structures. *J. Clin. Invest.* 74: 1559, 1984.
6. Kiessling R., Klein E., Proso H., Wigzell H.
Natural killer cell in the mouse. II Cytotoxic cells with specificity of the killer cell. *Eur J. Immunol.* 5: 117, 1975.
7. Ortaldo J.R., Sharrow S.O., Timonen T., Herberman R.B.
Determination of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 127: 2401, 1981.
8. Greenberg A.H., Shen L., Roitt I.M.
Characterization of the antibody-dependent cytotoxicity cell, a non phagocytic monocyte? *Clin. Exp. Immunol.* 615: 251, 1973.
9. Schevach E.M.
Macrophages and other accessory cells. En "Fundamental Immunology", W.E. Paul ed., Raven Press, USA, 1984, p. 71.
10. Nathan C.F.
Secretory products on macrophages. *J. Clin Invest.* 79: 319, 1987.

11. Berke G.
Cytotoxic T-lymphocytes. How do they function? Immunol. Rev 72: 5, 1983.
12. Hodes R.J., Hathcock K.S.
In vitro generation of suppressor cell activity: suppression of in vitro induction of cell mediated cytotoxicity. J. Immunol. 116: 167, 1976.
13. Gershon R.K., Eardley D.D., Drum S., Green D.R., Shen F.W., Yamauchi K., Cantor H., Murphy D.B.
Contrasuppression: a novel immunoregulatory activity. J. Exp. Med. 153: 1533, 1981.
14. Woody J.N., Bellanti J.A., W.S. Kenneth.
Immunogenetics. En "Immunology III", Bellanti J.A. ed., W.B. Saunders Company, 1985, p.54.
15. Swain S.L.
T cell subsets and the recognition of MHC class. Immunol. Rev. 74: 129, 1983.
16. Zinkernagel R.M., Doherty P.C.
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.
17. Miyajima A., Miyatake S., Schreurs Y., de Vries J., Arai N., Yokota T, Arai K.
Coordinate regulation of immune and inflammatory responses by T-cell derived lymphokines. Faseb J. 2: 2462, 1988.
18. Prud'homme G.J, Parfrey N.A.
Biology of Disease. Role of T helper lymphocytes in autoimmune diseases. Lab. Invest. 59: 158, 1988.
19. Bockman R.S.
Prostaglandin production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages: synthesis dependent on in vitro culture conditions. Prostaglandins 21: 9, 1981.
20. Nathan C.F., Silverstein S.C., Bruckner L.H., Cohn Z.A.
Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. J. Exp. Med. 149: 100, 1979.
21. Nowell P.C.
Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of normal human lymphocytes. Cancer Res. 20:462, 1960.

22. Cunningham B., Sela B.A., Yaharo I., Edelman G.
Structure and activities of lymphocyte mitogens. En "Mitogens in Immunobiology", Oppenheim J., Rosenstreich D., eds Academic Press, New York, 1976, p.13.
23. Sakane T., Green I.
Protein A from *Staphylococcus aureus*. A mitogen for human T lymphocytes and B lymphocytes but not L lymphocytes. J. Immunol. 120: 302, 1978.
24. Udey M.O., Chaplin D.D., Wedner H.J., 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.
25. Novogrodsky A.
A chemical approach for the study of lymphocyte activation. En "Mitogens in Immunobiology", Oppenheim J., Rosenstreich D., eds., Academic Press, New York, 1976, p.43.
26. Singer S.J., Nicolson G.L.
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175: 720, 1972.
27. Hume D.A., Weidemann M.
Membrane events in transformation. En "Mitogenic Lymphocyte Transformation", Elsevier North Holland, Biomedical Press, 1980, p.89.
28. Nicolson G., Poste G.
The Cancer Cell: dynamic aspects and modifications in cell surface organization. N. Engl. J. Med. 295: 197, 1976.
29. Traill K.N., Wick G.
Lipids and lymphocyte function. Immunol. Today 5: 70, 1984
30. Crumpton M.J., Auger J., Green N.M., Maino V.C.
Surface membrane events following activations by lectins and calcium ionophore. En "Mitogens in Immunobiology", Oppenheim J.J., Rosenstreich D.L., eds., Academic Press Inc., New York, 1976, p. 85.
31. Hirata F., Toyoshima S., Axelrod S., Waxdal M.J.
Phospholipid methylation : a biochemical signal modulating lymphocyte mitogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 862, 1980.

32. Ashman R. F.
Lymphocyte activation. En "Fundamental Immunology", Paul W.E., ed., Raven Press, New York, 1984, p.267.
33. Hadden J. W.
Transmembrane signals in the activation of T lymphocytes by mitogenic antigens. Immunol. Today, 9: 235, 1988.
34. King S.L.
An assessment of phosphoinositide hydrolysis in antigenic signal transduction in lymphocytes. Immunol. 65: 1, 1988.
35. Nishizuka Y.
Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. Science 255: 1365, 1984.
36. Exton J.H.
Mechanisms of action of calcium-mobilizing agonists. FASEB J. 2: 2670, 1988.
37. Cabot C.M., Welsh C.J., Cao H., Chabbot H.
The phosphatidylcholine pathway of diacylglycerol formation stimulated by phorbol diesters occurs via phospholipase D activation. FEBS letters 233: 153, 1988.
38. Hadden J.W., Coffey R.G.
Cyclic nucleotides in mitogen-induced lymphocyte proliferation. Immunology Today 3:11, 299, 1982.
39. Hume D.A., Weidemann M.J.
Intracellular second messengers. En "Mitogenic lymphocyte transformation" Elsevier, North Holland, 1980, p.183.
40. Coffey R.G., Hadden E.M., Hadden J.W.
Phytohemagglutinin stimulation of guanylate cyclase in human lymphocytes. J. Biol. Chem. 256: 4418, 1981.
41. Goldyne M.E., Stobo J.
Immunoregulatory role of prostaglandins and related lipids. CRC Crit. Rev. Immunol. 2: 189, 1981.
42. Ashcroft F.
Ion channels in lymphocytes. Immunol. Today 5: 232, 1984.
43. Luckasen J., White J.G., Kersey J.H.
Mitogenic properties of a Calcium Ionophore, A23187. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71: 5088, 1974.
44. Berridge M.J., Irvine R.F.
Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature 312: 315, 1984.

45. Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T.J.
T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in lymphocytes. *Nature* 295: 68, 1982.
46. Kuno M., Gardner P.
Ion channels activated by inositol 1,4,5-triphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes. *Nature* 326: 301, 1987.
47. Irvine R.F., Letcher A.J., Heslop J.P., Berridge M.J.
The inositol tris/tetrakisphosphate pathway-demonstration of $Ins(1,4,5)P_3$ -kinase activity in animal tissues. *Nature* 320: 631, 1986.
48. Votila P., Vapaatalo H.
Synthesis, pathways and biological implications of eicosanoids. *Ann. Clin. Res.* 16: 226, 1984.
49. Hamberg M., Samuelsson B.
Prostaglandin endoperoxides. Novel transformation of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 3400, 1974.
50. Hamberg M., Svenson J., Samuelsson B.
Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 2994, 1975.
51. Samuelsson B., Goldyne M., Granstrom E., Hamberg M., Hammarstrom S., Malmsten C.
Prostaglandins and thromboxanes. *Ann. Rev. Biochem* 47:997, 1978.
52. Vermylen J., Badenhorst P.N., Deckmyn H., Arnout J.
Normal Mechanisms of platelet function. En "Clinics in Haematology" Vol. 12, Harker L.A., Zimmerman T.S., eds., W.B. Sanders Company Ltd. 12:1, p.107, 1983.
53. Irvine R.F.
How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.* 204:3, 1982.
54. Cohen P., Dresken A.
Comparison of phospholipid and fatty acid composition of human erythrocytes and platelets. *Brit. J. Hematol.* 17: 359, 1969.
55. Blackwell G.J., Flower R.J.
Inhibition of phospholipase. *British Medical Bulletin* 39:3, 260, 1983.

56. Billah M.M., Lapetina E.G., Cuatrecasas P.
Phospholipase A₂ and phospholipase C activities of platelets. Differential substrate specificity, Ca²⁺ requirements, pH dependency and cellular localization. *J. Biol. Chem.* 255: 10227, 1980.
57. Lapetina E.G., Billah M.M., Cuatrecasas P.
Lysophosphatidic acid potentiates the thrombin-induced production of arachidonate metabolites in platelets. *J. Biol. Chem.* 256: 11984, 1981.
58. Billah M.M., Lapetina E.G., Cuatrecasas P.
Phospholipase A₂ activity specific for phosphatidic acid. A possible mechanism for the production of arachidonic acid in platelets. *J. Biol. Chem.* 256: 5399, 1981.
59. 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. Comm.* 90: 92, 1979.
60. Broekman M.J., Ward J.W., Marcus A.J.
Fatty acid composition of phosphatidyl inositol and phosphatidic acid in stimulated platelets. *J. Biol. Chem.* 256: 8271, 1981.
61. Broekman M.J., Ward J.W., Marcus A.J.
Phospholipid metabolism in stimulated human platelets. Changes in phosphatidylinositol, phosphatidic acid and lysophospholipids. *J. Clin. Invest.* 66: 275, 1980.
62. Hirata F.
Lipomodulin: a possible mediator of the action of glucocorticoids. En "Advances in prostaglandin, thromboxane and leukotriene research" Vol 11., Samuelsson, Paoletti, Ramwell, eds., Raven Press, 1983, p.73.
63. Walenga R., Vanderhoek J., Feinstein M.
Serine esterase inhibitors block stimulus-induced mobilization of arachidonic and phosphatidylinositide-specific phospholipase C activity in platelets. *J. Biol. Chem.* 255: 6024, 1980.
64. Moncada S.
Biological importance of prostacyclin. *Br. J. Pharmacol.* 76: 3, 1982.
65. Bryan Smith J.
The prostanoids in hemostasis and thrombosis. *Am. J. Pathol.* 99: 743, 1980.

66. Parker C.W.
Mediators: release and function. En "Fundamental Immunology", Paul W.E. ed., Raven Press, New York, 1984, p.731.
67. Aharony D., Bryan Smith J., Silver M.J.
Platelet arachidonate lipoxigenase. En "The leukotrienes", Chabrin L.W., Bailey D.M., eds, Academic Press, 1984, p. 104.
68. Murphy R.C., Hammarstrom S., Samuelsson B.
Leukotriene C: a slow reacting substance fom murine mastocytoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4275, 1979.
69. Gimeno A.
Leucotrienos y otros productos de lipoxigenasas. Naturaleza y perfil biológico. Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. 35: 67, 1985.
70. Westlund P., Edenius C., Lindgren J.K.
Evidence for a novel pathway of leukotriene formation in human platelets. Biochim. Biophys. Acta, 962: 105, 1988.
71. Serhan C.N., Fridovich J., Goetzi E.J., Dunham P.B., Weissman G.
Leukotriene B₄ and phosphatidic acid are calcium ionophores. J. Biol. Chem. 257: 4746, 1982.
72. Lewis R.A., Austen K.F., Drazen J.M., Clark D.A., Marfat A., Corey E.J.
Slow reacting substance of anaphylaxis: identificacion of leukotriene C₄ and D₄ from human and rat sources. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3710, 1980.
73. Lewis R.A., Austen F.K.
The biologically active leukotrienes. J. Clin. Invest. 73: 889, 1984.
74. Fleish J.H., Cloud M., Marshall W.S.
A brief review of preclinical and clinical studies with LY 171883 and some comments on newer cysteinyl leukotriene receptor antagonists. En "Biology of the leukotrienes", Levi R., Krell R., eds, Annals of the New York Academy of Sciences Vol. 524, 1988, p.356.
75. Serhan C.N., Hamberg M., Samuelsson B.
Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. Proc. Natl Acad. Sci. USA 81: 5335, 1984.

76. Mullane K.M., Pinto A.
Endothelium, arachidonic acid and vascular tone. Federation Proc. 46: 56, 1987.
77. Fitzpatrick F.A., Ennis M.D., Baze M.E., Wynalda M.A., McGee J.E., Liggett W.E.
Inhibition of cyclooxygenase activity and platelet aggregation by epoxyeicosatrienoic acids. J.Biol. Chem. 261: 15334, 1986.
78. Vane J.R.
Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nature 231: 232, 1971.
79. Higgs C.A., Vane J.R.
Inhibition of cyclooxygenase and lipoxigenase. Brit. Med. Bull. 39: 265, 1983.
80. Goodwin J.S., Behrens T.
Role of lipoxigenase metabolites of arachidonic acid in T cell activation. En "Biology of the leukotrienes", Levi R., Krell R., eds., Annals of the New York Academy of Sciences Vol. 524, 1988, p. 201.
81. de Gaetano G.
Platelets, prostaglandins and thrombotic disorders. En "Clinics in Haematology". Vol.10, Prentice C.R. M., ed., W.B. Saunders Company Ltd, 1981, p.297.
82. Bunting S., Gryglewski R., Moncada S., Vane J.R.
Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. Prostaglandins 12: 897, 1976.
83. Moncada S., Bunting S., Mullane K.M., Thorogood P., Vane J.A., Raz A., Needle P.
Imidazole: a selective potent antagonist of thromboxane synthetase. Prostaglandins 13: 611, 1977.
84. Gryglewski R.J.
Prostaglandin and thromboxane biosynthesis inhibitors. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 297: 585, 1977.
85. Downing D.T., Ahern D.G., Bacthta M.
Enzyme inhibition by acetylenic compounds. Biochem. Biophys. Res. Commun. 40: 218, 1970.
86. Taylor G.W., Morris H.R.
Lipoxygenase pathways. Brit. Med. Bull. 39: 219, 1983.

87. Vanderhoek J.Y., Bryant R.W., Martyn Bailey J.
Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte product 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid. *J. Biol. Chem.* 255: 10064, 1980.
88. Augstein Y., Farmer J.B., Lee T.B., Sheard P., Tattersall M.L.
Selective inhibitor of Slow Reacting Substance of Anaphylaxis. *Nature New Biology* 245: 215, 1973.
89. Moncada S., Higgs E.A.
Arachidonate Metabolism in blood cells and the vessel wall. En "*Clinics in Haematology*", Vol. 15, W.B. Saunders Company Ltd., 1986, p.273.
90. Hoffman T., Lizzio E.F., Tung A., Marshall L.A., Bouvino E. Jennings M.K.
Release of arachidonic acid metabolites by human monocytes or lymphocytes: effect of treatment with interferon on stimulation by phorbol ester or calcium ionophore. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 44: 82, 1987.
91. Pawlowski N.A., Kaplan G., Hamil A.L., Cohn Z.A., Scott W.A.
Arachidonic acid metabolism by human monocytes. Studies with platelet-depleted cultures. *J. Exp. Med.* 158: 393, 1983.
92. Higgs G.A., Moncada S., Vane J.R.
Eicosanoids in inflammation. *Annals of Clinical Research* 16: 287, 1984.
93. Ninnemann J.L.
Prostaglandins and Immunity. *Immunol. Today* 5: 170, 1984.
94. Ferraris V.A., de Rubertis F.R., Hudson T.H., Wolfe L.
Release of prostaglandin by mitogen and antigen stimulated leukocytes in culture. *J. Clin. Invest.* 54: 378, 1974.
95. Smith J.W., Steiner A.L., Parker C.W.
Human lymphocyte metabolism. Effects of cyclic and noncyclic nucleotides on stimulation by phytohemagglutinin. *J. Clin. Invest.* 50:442, 1971.
96. Goodwin J.S., Webb D.R.
Regulation of the immune response by prostaglandins. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 15: 106, 1980.
97. Goodwin J.S., Wick A., Lewis A., Bankhurst A., Williams C.
High affinity binding sites for prostaglandin E on human lymphocytes. *Cell Immunol.* 43: 150, 1979.

98. Kurlan J.L., Bockman R.
Prostaglandin E production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 147: 952, 1978.
99. Goodwin J.S., Banckhurst A., Messner R.P.
Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. Existence of a prostaglandin-producing suppressor cell. *J. Exp. Med.* 146: 1719, 1974.
100. Chouaib S., Chatenoud L., Klatzman D., Fradelizi D.
The mechanisms of inhibition of human IL-2 production. II. PGE₂ induction of suppressor T lymphocytes. *J. Immunol.* 132: 1815, 1984.
101. Baker P.E.
Prostaglandin inhibition of T-cell proliferation mediated at two levels. *Cell. Immunol.* 61: 52, 1981.
102. Walker C., Kristensen F., Bettens F., de Neck A.L.
Lymphokine regulation of activated (G₁) lymphocytes. I. Prostaglandin E₂-induced inhibition of IL-2 production. *J. Immunol.* 130: 1770, 1983.
103. Gordon D., Bray M.A., Morley J.
Control of lymphokine secretion by prostaglandins. *Nature* 262: 401, 1976.
104. Kunkel S.L., Chensue S.W., Phan S.H.
Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin-1 production. *J. Immunol.* 136: 186, 1986.
105. Thompson P.A., Jelinek D.F., Lipsky P.E.
Regulation of human B cell proliferation by prostaglandin E₂. *J. Immunol.* 133: 2446, 1984.
106. Staite N.D., Panayi G.S.
Prostaglandin regulation of B-lymphocyte function. *Immunol. Today* 5: 175, 1984.
107. Brunda M.S., Herberman R.B., Holden M.T.
Inhibition of natural killer cell activity by prostaglandins. *J. Immunol.* 114: 2682, 1975.
108. Leung K.H., Koren H.S.
Regulation of human natural killing. II. Protective effect of interferon on NK cells from suppression by PGE₂. *J. Immunol.* 129: 1742, 1982.

109. Kelly J.P., Johnson M.C., Parker C.W.
Effects of inhibitor of arachidonic acid metabolism on mitogenesis in human lymphocytes: possible role of thromboxanes and products of the lipoyxygenase pathway. *J. Immunol.* 122: 1563, 1979.
110. Awara W., Hiller K., Jones D.
Kinetics of prostaglandin E₂ and thromboxane A₂ synthesis and suppression of PHA-stimulated peripheral blood mononuclear leukocytes. *Immunol.* 59: 557, 1986.
111. Ceuppens J.L., Vertessen S., Deckmyn H., Vermylen J.
Effects of thromboxane A₂ on lymphocyte proliferation. *Cell. Immunol.* 90: 458, 1985.
112. Rola-Pleszcsynski M., Gagnon L., Bolduc D., Le Breton G.
Evidence for the involment of the thromboxane synthase pathway in human natural cytotoxic cell activity. *J. Immunol.* 135: 4114, 1985.
113. Weksler B.B., Knapp J.M., Jaffe E.A.
Prostacyclin synthesized by cultured endothelial cells modulates polymorphonuclear leukocyte function. *Blood* 50: 287, 1977.
114. Parker C.W.
Lipid mediators produced through the lipoxigenase pathway. *Ann. Rev. Immunol.* 5: 65, 1987.
115. Lee T.H., Mencia Huerta J.M., Shih Ch., Corey E.J., Lewis R.A., Austen K.
Effects of exogenous arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the generation of 5-lipoxigenase pathway products by ionophore-activated neutrophils. *J. Clin. Invest.* 74: 1922, 1984.
116. Goldyne M.E., Burrish G.F., Poubelle P., Borgeat P.
Arachidonic acid metabolism among human mononuclear leukocytes. Lipoyxygenase-related pathways. *J. Biol. Chem.* 259: 8815, 1984.
117. Maxmair S., Cook J., Aldigier J.C., Gualde N., Rigaud M.
Thymocyte cyclic AMP and cyclic GMP response to treatment with metabolites issued from the lipoyxygenase pathway. *J. Immunol.* 135: 1361, 1985.
118. Payan D.G., Goetzl E.J.
The dependence of human T-lymphocyte migration on the 5-lipoxigenation of endogenous arachidonic acid. *J. Clin. Immunol.* 1: 266, 1981.

119. Ford Hutchinson A.W., Bray M.A., Doig M.V., Shipley M.E., Smith M.J.H.
Leukotriene B₄ a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286: 264, 1980.
120. Goldman D.W., Gifford L.A., Marotti T., Koo C.H., Goetzl E.J.
Molecular and cellular properties of human polymorphonuclear leukocyte receptor for Leukotriene B₄. *Federation Proc.* 46:200, 1987.
121. Rola-Pleszsyński M., Borgeat P., Sirois P.
Leukotriene B₄ induces human suppressor lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108: 1531, 1982.
122. Payan D.G., Missirlian-Bastian A., Goetzl E.J.
Human T-lymphocyte subset specificity of the regulatory effects of leukotriene B₄. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8: 3501, 1984.
123. Gualde N., Atluru D., Goodwin J.S.
Effects of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid on proliferation of human T cells and T cell subsets. *J. Immunol.* 134: 1125, 1985
124. Atluru D., 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.
125. Rola-Pleszczynski M., Lemaire I.
Leukotrienes (LTB₄) augment interleukin-1 production by human monocytes. *J. Immunol.* 135: 3958, 1985.
126. Rola-Pleszczynski M., Chavaille P.A., Lemaire I.
Stimulation of interleukin-2 and interferon gamma production by leukotriene B₄ in human lymphocyte cultures. *Prostaglan. Leukotr. Med.* 23: 207, 1986.
127. Goodwin J.S., Atluru D., Sierakowski S., Lianos E.A.
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.
128. Atluru D., Goodwin J.S.
Leukotriene B₄ causes proliferation of Interleukin-2 dependent T cells in the presence of suboptimal levels of Interleukin-2. *Cell. Immunol.* 99: 444, 1986.

129. Goldman D.W., Olson D.M., Payan D.G., Gifford L.A., Goetzl E.J.
Development of receptors for LTB₄ on HL-60 cells induced to differentiate by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. J. Immunol. 136: 12, 1986.
130. Seaman, W.E., Woodcock J.
Human and murine natural killer cell activity may require lipoygenation of arachidonic acid. J. Allergy Clin. Immunol. 74: 407, 1984.
131. Jondal M., Kullman C., Rossi P., Lindgren J.A.
Second messenger function of arachidonic acid lipoygenation products in human Natural Killer cell lysis? Scand. J. Immunol. 22: 285, 1985.
132. Carine K., Hudig D.
Assesment of a role for phospholipase A₂ and arachidonic acid metabolism in human lymphocyte Natural Cytotoxicity. Cell. Immunol. 87: 270, 1984.
133. Seaman W.E.
Human Natural Killer cell activity is reversibly inhibited by antagonists of lipoygenation. J. Immunol. 131: 2953, 1983.
134. Gagnon L., Gerard M., Sullivan A.K., Rola-Pleszczynski M.
Augmentation of human natural cytotoxic cell activity by LTB₄ mediated by enhanced effector-target cell binding and increased lytic efficiency. Cell. Immunol. 110: 243, 1987.
135. Johnson H.W., Russell J.K., Torres B.A.
Second messenger role of arachidonic acid and its metabolites in interferon- γ production. J. Immunol. 137: 3053, 1986.
136. Webb D. R., Nowowiejski I., Healy C., Rogers T.J.
Immunosuppressive properties of leukotrienes D₄ and E₄ in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun. 104: 1617, 1982.
137. Goetzl E.J.
Selective feed-back inhibition of the 5-lipoygenation of arachidonic acid in human T-lymphocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101: 344, 1981.
138. Bailey J.M., Bryant R.W., Low C.E., Pupillo L.M., Vanderhoek J.
Regulation of T-lymphocyte mitogenesis by the leukocyte product 15-HETE. Cell. Immunol, 67: 112, 1982.

139. Ranstedt U.J., Serhan C.N., Wigzell H., Samuelsson B.
Action of novel eicosanoids, Lipoxin A and B on human natural killer cells cytotoxicity; effects on intracellular c AMP and target cell binding. *J. Immunol.* 135:3434, 1985.
140. Anders H., Serhan C.N., Haeggstrom J., Ingelman-Sundberg M., Samuelsson B.
Activation of Protein Kinase C by lipoxin A and other eicosanoids. Intracellular action of oxygenation products of arachidonic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 1215, 1986.
141. Foon K.A., Todd R.F.
Immunological classification of Leukemia and Lymphoma. *Blood* 69:1, 1986.
142. Cooper M.D.
B lymphocytes. Normal development and function. *N. Engl. J. Med.* 3: 1452, 1987.
143. Horibe K., Knowles R.W.
Human B lymphocyte antigens detected by the workshop monoclonal antibodies. A comparison of the serological and immunochemical patterns. En "Leukocyte Typing II" Vol. 2, Reinherz, Haynes, Nadler, Bernstein eds., Springer-Verlag, New York, 1986, p.187.
144. Zola H.
The surface antigens of human B lymphocytes. *Immunol. Today* 8: 308, 1987.
145. Gupta S.
Rosette formation with mouse erythrocytes. II. A marker for human B and non T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 25: 319, 1976.
146. Foon K.A., Gale R.P.
Immunological classification of Lymphoma and Lymphoid Leukemia. *Blood Rev.* 1:77, 1987.
147. Gale R.P., Foon K.A.
Biology of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Seminars in Hematology* 24: 209, 1984.
148. Totterman T.H., Nilsson K., Sundstrom C.
Phorbol ester-induced differentiation of Chronic Lymphocytic Leukemia cells. *Nature* 288: 176, 1980.

149. Caligaris Cappio F., Pizzolo G., Chilosi M., Bergui L., Semenzato G., Tesio L., Morittu L., Malavasi F., Gobbi M., Schwarting R., Campana D., Janossy G.
Phorbol ester induces abnormal Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to express features of Hairy Cell Leukemia. *Blood*: 1035, 1985.
150. Auberbach R.
Angiogenesis-inducing factors: A review. en "Lymphokines 4", Pick E., ed., Academic Press, New York, 1981, p. 69.
151. Mundy G.R.
Control of osteoclast function by lymphokines in health and disease. en "Lymphokines 4", Pick E. ed., Academic Press, New York, 1981, p. 395.
152. Baldwin W.H.
The symbiosis of immunocompetent and endothelial cells. *Immunol. Today* 3: 267, 1982.
- 153 Rossi V., Breviario F., Ghezzi P., Dejana E., Mantovani A.
Prostacyclin synthesis induced in vascular cells by interleukin-1. *Science* 229: 174, 1985.
154. Dejana E., Breviario F., Balconi G., Rossi V., Remuzzi G., de Gaetano G., Mantovani A.
Stimulation of prostacyclin synthesis in vascular cells by mononuclear cell products. *Blood* 64: 1280, 1984.
155. Eldor A., Fridman R., Vlodaysky I., Hy-Am E., Fuks Z., Panet A.
Interferon enhances prostacyclin production by cultured vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 73: 251, 1984.
156. Hall E.R., Papp A.C., Seifert W.E. jr, Wu K.K.
Stimulation of endothelial cell prostacyclin formation by interleukin-2. *Lymphokine Research* 5: 87, 1986.
157. Lazzari M.A., Schattner M.A., Finiasz M., Gimeno M.
Platelet aggregating substance from mononuclear leukocytes. *Prostaglan. Leuk. Med.* 22: 275, 1986.
158. Blalock J.E.
Relationships between neuroendocrine hormones and lymphokines. En "Lymphokines 9", Pick E., ed., 1984, p.1.
159. Johnson H.M., Smith E.M., Torres B.A., Blalock J.E.
Regulation of the in vitro antibody response by neuroendocrine hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4171, 1982.

160. Coffey R.G., Hadden J.W.
Neurotransmitters, hormones and cyclic nucleotides in lymphocyte regulation. *Fed. Proc.* 44: 112, 1985.
161. Smith E.M., Morrill A.C, Meyer W.J., Blalock J.E.
Corticotrophin releasing factor induction of leukocyte derived immunoreactive ACTH and endorphins. *Nature* 321: 881, 1986.
162. Lolait S.J., Lim A.T.W., Toh B.H., Funder J.W.
Immunoreactive beta-endorphin in a subpopulation of mouse spleen macrophages. *J. Clin. Invest.* 73: 277, 1984.
163. Zurawski G. Benedik M., Kamb B.S., Abrams J.S., Zurawski S.M., Lee F.D.
Activation of mouse T-helper cell induces abundant prepro-enkephalin mRNA synthesis. *Science* 232: 772, 1986.
164. Smith E.M., Phan M, Coppenhaver D., Kruger T.E., Blalock J.E.
Human lymphocyte production of immunoreactive thyrotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6010, 1983.
165. Sterin-Borda L., Borda E., Fink S., Bracco M.M.
Effect of phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes on isolated rat atria. Participation of lipoxigenase products of arachidonate metabolism. *Naunym. Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac.* 324:58, 1983.
166. Fink S., Finiasz M., Sterin-Borda L., Borda E., Bracco M.M.
Lymphocyte-induced stimulation of the contractile response of the heart. *Int J. Immunopharmac.* 10: 53, 1988.
167. Fink S., Finiasz M., Borda E., Sterin-Borda L., Bracco M.M.
Stimulation of heart contractility by supernatants from lectin activated lymphocytes. Role of IL-2. aceptado para su publicaci3n en *Int. J. Immunopharmac.*, 1988.
168. Boyum A.
Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Lab. Invest.*, 21 (supl 97): 77, 1968.
169. Holm J.M., Wigzell H.
Surface markers of human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non immune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.* 136: 207, 1972.
170. Pearson G.R., Orr T.W.
Antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity against cells expressing Epstein-Barr Virus antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* 56: 485, 1976.

171. Rossum J.M.
Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making and evaluation of drug parameters. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 143: 299, 1963.
172. Parker C.W., Kelly J.P., Falkenheim S.F., Huber M.G.
Release of arachidonic acid from human lymphocytes in response to mitogenic lectins. J. Exp. Med. 6: 1487, 1979.
173. di Minno G., Bertelé V., Bianchi L., Barbieri B., Cerletti C., Dejana E., de Gaetano G., Silver M.J.
Effects of an epoxyethano stable analogue of prostaglandin endoperoxides (U-46619) on human platelets. Thromb. Haemos. 45: 193, 1981.
174. Clement L.T., Yamashita N., Martin A.M.
The functionally distinct subpopulations of human CD4+ helper/inducer T lymphocytes defined by anti-CD45R antibodies derive sequentially from a differentiation pathway that is regulated by activation-dependent post-thymic differentiation. J. Immunol. 141: 1464, 1988.
175. Darnle N.K., Mohagheghpour N., Hansen J.A., Engelman E.G.
Alloantigen-specific cytotoxic and suppressor T lymphocytes are derived from phenotypically distinct precursors. J. Immunol. 131: 2296, 1983.
176. Reinherz E., Schlossman S.
The characterization and function of human immunoregulatory T lymphocyte subsets. Pharmacol. Rev. 34: 17, 1982.
177. Leivestad T., Halvorsen R., Gaudernack G., Thorsby E.
Requirements for phytohaemagglutinin activation of resting pure CD4+ and CD8+ T cells. Scand. J. Immunol. 27: 565, 1988.
178. Burka J.F., 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.
179. Ghelani A.M., Holroyde M.C., Sheard P.
Response of human isolated bronchial and lung parenchymal strips to SRS-A and other mediators of asthmatic bronchospasm. Br. J. Pharmacol. 71: 107, 1980.
180. Feurstein G., Hallenbeck J.
Leukotrienes in health and disease. Faseb J. 1: 186, 1987.

181. Terashita Z., Fukui H., Hirata M., Terao S., Ohkawa S., Nishikawa K., Kiruchi S.
Coronary vasoconstriction and PGI₂ release by leukotrienes in isolated guinea pig hearts. *Eur. J. Pharmacol.* 73: 357, 1981.
182. Salarí H.
Immunological and non-immunological release of leukotrienes and histamine by guinea-pig heart. *Immunol.* 58:473, 1986.
183. Letts L.G., Piper P.
The actions of leukotriene C₄ and D₄ on guinea-pig isolated hearts. *Br. J. Pharmacol.* 76: 169, 1982.
184. Bjornsson O.G., Williamson J.R.
Prolonged suppression of coronary flow rate and cardiac work induced by leukotriene D₄, and the reversal of this effect by activators of adenylate cyclase. In "Biology of the leukotrienes", Levi R., Krell R.D., eds., *Annals of the New York Academy of Sciences* Vol. 524, 1988, p.75.
185. Sterin-Borda L., Canga L., Pissani A., Gimeno A.L.
Inotropic effect of PGE₁ on isolated rat atria. Influence of adrenergic mechanisms. *Prostaglandins* 20: 825, 1980.
186. Goldyne M.E., Stobo J.D.
Human monocytes synthesize eicosanoids from T lymphocyte-derived arachidonic acid. *Prostaglandins* 24: 623, 1982.
187. Parker C.W., Stenson W.F., Huber M., Kelly J.P.
Formation of Thromboxane B₂ and hydroxylarachidonic acids in purified human lymphocytes in the presence and absence of PHA. *J. Immunol.* 122: 1572, 1979.
188. Borbóla J., Susskand K., Siess M., Szekeres L.
The effects of arachidonic acid in isolated atria of guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.* 41: 27, 1977.
189. Beld S., Talesnik J.
Coronary vasoconstrictor and vasodilator actions of arachidonic acid in the isolated perfused heart of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 75: 269, 1982.
190. Simon P.L., Clark M.A.
The role of PLAP and PLA₂ in the induction of interleukin-2 by interleukin-1 in T-cells. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 46: 1946 (abstract), 1987.

191. Russell J.K., Torres B.A. Johnson H.M.
Phospholipase A₂ treatment of lymphocytes provides helper signal for interferon- γ induction. Evidence for second messenger role of endogenous arachidonic acid. J. Immunol. 139: 3442, 1987.
192. Mc.Phail L.C., Clayton C.C., Snyderman R.
A potential second messenger role for unsaturated fatty acids: activation of Ca²⁺ - dependent kinase. Science 224: 622, 1984.
193. Bromberg J., Pick E.
Unsaturated fatty acids as second messengers of superoxide generation by macrophages. Cell. Immunol. 79: 240, 1983.
194. Sakata A., Ida E., Tominaga M., Onoue K.
Arachidonic acid release acts as an intracellular activator of NADPH-oxidase in Fc γ receptor-mediated superoxide generation in macrophages. J. Immunol. 138: 4553, 1987.
195. Spector A., Yorek M.
Membrane lipid composition and cellular function. J. Lip. Res. 26: 1015, 1985.
196. Mei Huang E., Detwiler T.C.
Characteristic actions of platelet agonists. Blood 57: 685, 1981.
197. Villa S., Colotta F., de Gaetano G., Semeraro N.
Arachidonic acid and leukotriene B₄ induce aggregation of human peripheral blood mononuclear leucocyte in vitro. Brit. J. Haematol. 58: 137, 1984.
198. Lazzari M.A., Schattner M.A., Finiasz M., Gimeno M.
Human lymphocyte aggregation? Prostagland. Leukotr. Med. 15: 303, 1984.
199. Humes J., Sadowski S., Galavage M., Goldenberg M., Subers E., Bonney R.J., Kuehl F.A.
Evidence of two sources of arachidonic acid for oxidative metabolism by mouse peritoneal macrophages. J. Biol. Chem. 257: 1591, 1982.
200. Conrad Liles W., Meier K.E., Henderson W.R.
Phorbol Myristate acetate and the calcium ionophore A 23187 synergistically induce release of LTB₄ by human neutrophils: involvement of protein kinase C activation in regulation of the 5-lipoxygenase pathway. J. Immunol. 138: 3396, 1987.

201. Halenda S.P., Zavoico G., Feinstein M.
Phorbol esters and oleoyl acetoxy glycerol enhance release of arachidonic acid in platelets stimulated by Ca^{2+} ionophore A 23187. *J. Biol. Chem.* 255: 6024, 1985.
202. Humes J.L.
Regulation of leukotriene formation in inflammatory cells. En "Biology of the leukotrienes", Levi R., Krell R., eds., *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol. 524, 1988, p. 252.
203. Hoffman T, Lizzio E, Suissa J., Rotrosen D., Sullivan J.A., Mandell G.L., Bonvini E.
Dual stimulation of phospholipase activity in human monocytes. Role of calcium-dependent and calcium-independent pathways in arachidonic acid release and eicosanoid formation.
204. Kelly J.P., Parker, C.W.
Effects of arachidonic acid and other unsaturated fatty acids on mitogenesis in human lymphocytes. *J. Immunol* 122:1556, 1979.
205. Tsukada T., Nakashima K., Shirakawa S.
Arachidonate 5-lipoxygenase show potent antiproliferative effects on human leukemia cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140: 832, 1986.
206. Bennett A.
Prostanoids and cancer. *Ann. Clin. Res.* 16: 314, 1984.
207. Santoro M.G., Antonelli C., Benedetto A., Amici C.
Modulation of the growth of a human erythroleukemic cell line (K562) by prostaglandins: antiproliferative action of PGA. *Cancer Res.* 46: 6073, 1986.
208. Huttner J.J., Gwebu E.T., Panganamala R.V., Milo G.E., Cornwell D.G.
Fatty acids and their prostaglandin derivatives: inhibitors of proliferation in aortic smooth muscle cell. *Science* 197: 289, 1977.
209. Vicenzi E., Lampugnani M.G., Bolognese Dalessandro A.P., Niewiarowska A., de Gaetano G., Donati M.B.
Dissociation between thromboxane generation and metastatic potential in cells from a murine fibrosarcoma. Studies with a selective thromboxane synthase inhibitor. *Int. J. Cancer.* 39: 488, 1987.

210. Chiabrando C., Brogginì M., Castgnoli M.N., Donelli M.G., Nosedà A., Visintainer M., Garattini S., Fanelli R.
Prostaglandin and thromboxane synthesis by Lewis lung carcinoma during growth. *Cancer Res.* 45: 3605, 1985.
211. Honn K.V., Cicone B., Skoff A.
Prostacyclin: a potent antimetastatic agent. *Science* 212: 1270, 1981.
212. Goerig M., Habenicht A.J.R., Heitz R., Zeh W., Katus H., Kommerell B., Ziegler R., Glomset J.
sn-1,2-diacylglycerols and phorbol diesters stimulate thromboxane synthesis by de novo synthesis of prostaglandin H synthase in human promyelocytic Leukemia cells. *J. Clin. Invest.* 79: 903, 1987.
213. Aussel C., Mary D., Fehlman M.
Prostaglandin synthesis in human T cells : its partial inhibition by lectins and anti-CD3 antibodies as a possible step in T cell activation. *J. Immunol.* 138:3094, 1987.
214. Hubbard W.C., Alley M.C., Mc Lemore T.L., Boyd M.R.
Evidence for a thromboxane biosynthesis in a human lung adeno carcinoma cell line A 459. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 46: 692 (abstract), 1987.

1
2
3