

Tesis de Posgrado

Miocarditis autoinmune experimental : regulación de la actividad cardíaca por la respuesta inmune

Pérez Leirós, Claudia

1990

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:

Pérez Leirós, Claudia. (1990). Miocarditis autoinmune experimental : regulación de la actividad cardíaca por la respuesta inmune. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2324_PerezLeiros.pdf

Cita tipo Chicago:

Pérez Leirós, Claudia. "Miocarditis autoinmune experimental : regulación de la actividad cardíaca por la respuesta inmune". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2324_PerezLeiros.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

MIOCARDITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL: REGULACION DE
LA ACTIVIDAD CARDIACA POR LA RESPUESTA INMUNE

Claudia Pérez Leirós

Director: Enri Santiago Borda

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)
(ex- CEFAPRIN) Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas (CONICET).

Tesis presentada para optar al título de Doctor en
Ciencias Químicas

1990

2324
ef 2

A Norberto, Santi y Francisco, por la
comprensión y el amor, todos los días.

A mis padres y a mis hermanos, que dicen
tanto con tan pocas palabras.

A mis amigos, los de siempre.

Agradecimientos

Al Dr. Enri Santiago Borda por su orientación, consejos y apoyo constante.

Al Dr. Patricio Cossio, quien inició estos estudios, y al Dr. Roberto Arana y el personal del CEMIC, por su disposición y colaboración para realizar los estudios histológicos y de inmunofluorescencia.

A la Dra. Leonor Sterin de Borda por el interés y dedicación que manifestó en la discusión y elaboración de este trabajo.

A la Dra Maria Leonor Cantore por su disposición para enseñarme y colaborar en los ensayos preliminares de adenilato ciclasa.

A la Dra Alcira Nesse, que me inició en la investigación.

A Maria Elena Sales, por las palabras y los silencios compartidos.

A mis compañeros del laboratorio, a los que me enseñaron y ayudaron.

A todo el personal del Instituto por el apoyo prestado.

Al CEFAPRIN y al CONICET por darme la oportunidad y los medios para desarrollar estas investigaciones.

INDICE

ABREVIATURAS	10
CAPITULO I - INTRODUCCION	12
1. RESPUESTA INMUNE. MECANISMOS BASICOS DE REGULACION	13
1.1. Circuitos inmunológicos de regulación	16
1.1.1. Alteraciones en la función inmune: Autoinmunidad	18
1.2. Interacción del sistema inmune y el sistema neuroendócrino : Ramas aferentes y eferentes	25
2. FUNCION CARDIACA. REGULACION POR EL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO Y OTROS MECANISMOS	27
2.1. Sistema adrenérgico. Receptores β adrenérgicos	31
2.1.1. Mecanismo de activación y su relación con la función contractil	32
2.1.2. Regulación de la función efectora	36
2.2. Sistema colinérgico. Receptores colinérgicos muscarínicos	39
2.2.1. Relación de los mecanismos de activación con la función cardíaca	40
2.2.2. Regulación de la actividad muscarínica	42
2.3. Leucotrienos como moduladores de la actividad cardíaca	44
2.3.1. Efectos de LTC ₄ y LTD ₄ sobre el corazón	46
3. FENOMENOS INMUNOPATOLOGICOS QUE COMPROMETEN AL MIOCARDIO	47

3.1. Cardiomiopatía chagásica	48
3.2. Miocarditis virales	50
3.3. Otros procesos inmunes asociados con el miocardio.	52
3.4. Modelos experimentales	53
4. OBJETIVOS DE ESTA TESIS	54
CAPITULO II - MATERIALES Y METODOS	55
1. ANIMALES	56
2. INMUNIZACIONES	56
3. ESTUDIOS HISTOLOGICOS	57
4. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	58
4.1. Sobre cortes de tejido muscular estriado	58
4.2. Sobre cultivos primarios de miocardiocitos	59
4.3. Procedimientos para la absorción de sueros	60
5. METODOS EMPLEADOS PARA EL FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACION DE POBLACIONES CELULARES	61
5.1. Preparación de las suspensiones celulares.	61
5.2. Remoción de las células adherentes al plástico	61
5.3. Aislamiento de células adherentes	62
5.4. Purificación de células T	62
5.4.1. Tratamiento con anti-Thy y complemento	63
5.4.2. Tratamiento con anti-L3T4 y anti Lyt 2.2 y complemento	63

5.5. Purificación de células B.	64
5.6. Obtención de sobrenadantes libres de células .	64
6. AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES Y PURIFICACION DE LA FRACCION IgG	65
7. VALORACION DE LA ACTIVIDAD MECANICA	66
7.1. Preparación del tejido	66
7.2. Registro de la actividad contractil	67
7.3. Relación entre dosis y efecto	69
8. RECEPTORES β ADRENERGICOS	71
8.1. Preparación de membranas	71
8.2. Identificación de receptores β adrenérgicos	73
8.3. Estudios de unión de [3 H]-DHA. Ensayos de desplazamiento	75
8.4. Ensayos de saturación	75
9. RECEPTORES COLINERGICOS MUSCARINICOS	77
9.1. Preparación de las suspensiones de membrana	77
9.2. Identificación de receptores	78
9.3. Ensayos de desplazamiento	79
9.4. Ensayos de saturación	80
10. DOSAJE DE LEUCOTRIENO C4 (LTC4)	80
11. DOSAJE DE NUCLEOTIDOS CICLICOS	81
12. DROGAS USADAS	82

13. ANALISIS ESTADISTICO	83
CAPITULO III - RESULTADOS	84
1. CARACTERIZACION DEL MODELO DE MIOCARDITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL : EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL	85
1.1. Estudios histologicos	85
1.2. Ensayos de inmunofluorescencia	88
2. EVALUACION DE LA FUNCION DEL MIOCARDIO AUTOINMUNE	92
2.1. Parametros contractiles	92
2.2. Participación de metabolitos del ácido araquidónico	92
3. ROL DE LAS CELULAS INMUNOLOGICAMENTE COMPETENTES EN LA DISFUNCION DEL MIOCARDIO	97
3.1. Efecto de las celulas linfomononucleares de animales inmunizados sobre auriculas normales	.101
3.2. Participación de linfocitos T en el efecto depresor103
3.3. Liberación de LTC4 inducida por las celulas "autoinmunes".107
4. EFECTOS BIOLOGICOS DE SUEROS E IgG DE RATONES CON MIOCARDITIS SOBRE EL MIOCARDIO110
4.1. Estudios sobre los parametros contractiles	.110
4.1.1. Efecto de los sueros: Las inmunoglobulinas responsables de la actividad sérica110
4.1.2. Caracterización del efecto depresor	.113.
4.2. Niveles de nucleotidos ciclicos	.115

4.2.1. Efecto de la IgG autoinmune sobre los niveles de AMPc y GMPc. Dependencia del tiempo y de la concentración	.120
4.2.2. Características farmacológicas del efecto de la IgG autoinmune sobre los niveles de nucleótidos cíclicos	.121
5. INTERACCION DE LA IgG AUTOINMUNE CON LOS RECEPTORES β ADRENERGICOS Y COLINERGICOS MUSCARINICOS EN MEMBRANAS CARDIACAS	.124
5.1. Receptores β adrenérgicos.	.124
5.1.1. Ensayos de desplazamiento	.124
5.1.2. Cálculo de los parámetros de unión en presencia de la IgG autoinmune	.125
5.2. Receptores colinérgicos muscarínicos	.128
5.2.1. Ensayos de desplazamiento	.131
5.2.2. Cálculo de los parámetros de unión: Efecto de la IgG autoinmune	.131
6. ESTUDIOS DE ESPECIFICIDAD	.136
6.1. Especificidad de especie	.136
6.2. Especificidad de órgano	.136
CAPITULO IV - DISCUSION	.140
CAPITULO V - CONCLUSIONES	.170
CAPITULO VI - BIBLIOGRAFIA	.174

Abreviaturas

Ag = antígeno

Ac = anticuerpo

CMH = complejo mayor de histocompatibilidad

CPA = célula presentadora de antígeno

PM = peso molecular

Ig = inmunoglobulina

CLM = células linfomononucleares

ATP = adenosina 5'-trifosfato

ADP = adenosina 5'-difosfato

AMPc = adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

GTP = guanosina 5'-trifosfato

GDP = guanosina 5'-difosfato

GMPc = guanosina 3',5'-monofosfato cíclico

AA = ácido araquidónico

Ach = acetilcolina

LT = leucotrieno

PGI₂ = prostaciclina

TXA₂ = tromboxano A₂

TXB₂ = tromboxano B₂

PGH = prostaglandina H

SRL-A = sustancia de reacción lenta de la anafilaxia

CDI = cardiopatía dilatada idiopática

SST = solución salina tamponada

AFC = adyuvante de Freund completo

SFB = suero fetal bovino

KRB = Krebs-Ringer-bicarbonato

Fc = frecuencia contractil

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

1. RESPUESTA INMUNE. MECANISMOS BASICOS DE REGULACION

La función primaria del sistema inmune es la eliminación de macromoléculas extrañas y partículas vivas que las transportan. Para llevar a cabo esta función, el sistema inmune debe reconocer tales estructuras específicamente y distinguirlas de la compleja arquitectura molecular de lo propio. Esta propiedad de discriminar con tan alta especificidad resulta, para muchos investigadores, semejante a la observada en el sistema nervioso.

El sistema inmune funciona con un acople estímulo-respuesta, cuya característica sobresaliente es su extraordinaria especificidad: La base molecular de esta especificidad está dada, por un lado, por los genes que codifican para las inmunoglobulinas y los receptores en las células T y por otra parte, por los mecanismos desarrollados por este sistema para diversificar los productos de estos genes, a través de un extraordinario proceso de recombinación somática (1, 2).

Frente a esta inmensa variedad de "receptores de antígenos (Ags)" altamente específicos, la pregunta es cómo se organiza el sistema para responder. La idea es que el antígeno (Ag) selecciona y estimula la proliferación de un pequeño grupo de linfocitos -B y T- que son los que poseen los receptores para ese Ag (3, 4). Además cuenta con la capacidad de amplificar la respuesta mediante interacciones celulares. Por ejemplo, la proliferación y diferenciación de células específicas llevan a un

estado de exaltada reactividad, frente a un Ag contactado previamente, gracias a una "memoria inmunológica".

Además de los estímulos externos generados por macromoléculas extrañas, el sistema inmune ejerce también un control interno al regular su propio funcionamiento, nuevamente a través de interacciones celulares. El rol principal de este aparato regulatorio es el de limitar la respuesta al tiempo que evita que el sistema se vuelva contra el medio interno: Las respuestas generadas contra estructuras propias -si aparecieran- son eliminadas con supresión de las células respondedoras.

Todas las respuestas inmunes dependen de una compleja red de comunicación intercelular que incluye interacciones específicas y no específicas (5).

Las células B acoplan la información de especificidad y la de función en una sola molécula, el anticuerpo (Ac). Por su parte, las células T restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) reconocen Ags en la superficie de otras células -presentadoras- sólo si éstas poseen el producto del CMH apropiado.

Las células T activadas -y su progenie resultante- responden con tres clases de interacciones celulares. La primera es la producción de una gran variedad de linfoquinas, como se denomina a una serie de factores sin especificidad de Ag que juegan roles diversos entre los que se cuentan las interleuquinas 1 a 6, interferón y otros (6, 7). La segunda es la colaboración T-B, un

proceso complejo en el cual las células B y T, ambas reactivas contra un Ag, forman secuencialmente un "puente de Ag", se vuelven altamente adherentes entre sí y tiene lugar la interacción T-B, restringida por el CMH (8). La última tiene que ver con la capacidad de algunas células T de evolucionar a linfocitos citotóxicos específicos de Ag, capaces de infligir daños sobre las células blanco que transportan ese Ag. Junto con esta última propiedad, cabe mencionar la capacidad de algunos linfocitos de diferenciarse a T supresores, linfocitos que serían responsables de limitar la formación de anticuerpos (Acs) y la función T activadora. Actualmente se discute esta proposición debido a que las células T supresoras, al no ser capaces de producir clones duraderos como las activadoras o las citotóxicas, no han podido emplearse para análisis bioquímicos y funcionales detallados (9).

Mientras los Acs pueden unir Ags en solución, las células T están restringidas a Ags dispuestos sobre superficies celulares. La razón para esto es que el receptor T está preparado para reconocer fragmentos antigénicos o epitopes en asociación molecular con Ags del CMH. Estos pueden ser de dos tipos, de clase I o de clase II. La regla universal es que, cuando un receptor de linfocito T reconoce un Ag en asociación con un producto del CMH de clase I, éste es siempre de un tipo determinado, llamado en humanos $CD8^+$ (en ratón $Lyt\ 2^+, 3^+$) distinguible por marcadores de membrana que unen Acs monoclonales

específicos. Por otro lado, cuando el reconocimiento del Ag se da junto con un producto del CMH de clase II, entonces se trata de un linfocito CD4⁺ (L3T4⁺ murino) (6).

El receptor T, entonces, con su complejo sistema de reconocimiento antigénico, necesita una célula presentadora de Ag. Este rol lo cumplen las llamadas células accesorias que incluyen a los macrófagos, las células dendríticas, endoteliales, de Langerhans y similares. Estas células procesan los Ags y exponen sus fragmentos en la membrana en asociación con moléculas del CMH de clase II (6, 10).

1.1. Circuitos inmunológicos de regulación

La pregunta que se desprende al estudiar el sistema inmune - sus mecanismos de respuesta, amplificación y memoria- es cómo la respuesta no se perpetúa y, en cambio, el sistema es capaz de volver a un estado quiescente y mantener la homeostasis.

Existen numerosas evidencias que sugieren que la expresión de reactividad inmune es el resultado de un delicado balance entre influencias inmunoregulatorias positivas y negativas, mediadas por distintos tipos celulares, directamente o a través de factores solubles (11, 12).

En sí, los mecanismos de regulación pueden agruparse en tres tipos: aquellos mediados por Acs, por linfocitos T o por la red

idiotipo-anti-idiotipo (13).

La producción de Acs favorece en gran medida la fagocitosis y catabolismo del Ag. Además, la captación del Ag por los Acs hace cada vez más difícil -salvo para receptores celulares de muy alta afinidad- atraer los Ags en continua disminución y, así, impide la activación de nuevas células. En este sentido, el entrecruzamiento de grandes cantidades de complejos Ag-Ac sobre los receptores linfocitarios también actúa como señal negativa. Se ha sugerido, inclusive, cierta actividad directa de los Acs sobre las células T supresoras y T activadoras (13).

En los procesos regulatorios que dependen de los linfocitos T, intervienen también células accesorias y factores solubles. Un componente necesario en la regulación de la respuesta es la generación de influencias supresoras por parte de células especializadas. Existen subtipos de células T supresoras con especificidad para el Ag que, a través de interacciones directas o factores solubles, pueden inhibir la respuesta (14, 15). Se ha descrito una población T supresora capaz de inactivar a los linfocitos B por un mecanismo semejante a la activación T-B, también restringido por moléculas de clase II (16). Asimismo se conocen diversos factores inmunosupresores liberados por estas células que impiden la actividad T colaboradora (14, 15). Recientemente se ha postulado la existencia de un circuito de contrasupresión que funcionaría por bloqueo del receptor para el Ag, tanto la inmunoglobulina como el receptor T (17).

En tercer lugar, se ha propuesto la teoría de la red idiotípica como un mecanismo importante de inmunoregulación (18). Las moléculas de inmunoglobulina (Ig) -en solución o unidas a linfocitos B- y el receptor T tienen epitopes propios ubicados en o cerca de la zona de combinación con el Ag, llamados idiotipos. Para cada determinante idiotípico inherente a un receptor para Ag existe otro clon de células reactivas contra el Ag cuyo receptor contiene un determinante complementario o anti-idiotipo. En este marco, el sistema inmune puede verse como una gran red enlazada por el reconocimiento inmunológico de sus propios idiotipos. Las perturbaciones iniciadas al entrar un Ag producen interacciones sucesivas de células portadoras de idiotipos y anti-idiotipos, interacciones que han demostrado tener un rol importante en la regulación del sistema inmune en diferentes modelos (19, 20).

En conclusión, la respuesta inmune puede entenderse como una respuesta homeostática que, en condiciones fisiológicas, contribuye al mantenimiento de la constancia e integridad de las células y tejidos. A estos efectos, el sistema cuenta con diversos mecanismos de activación, específicos e inespecíficos y, paralelamente, tiene circuitos regulatorios que previenen la perpetuación de la respuesta, así como la reactividad contra Ags propios.

1.1.1. Alteraciones de la función inmune: Autoinmunidad

Los organismos superiores no desarrollan normalmente reactividad inmune contra sus propias moléculas, aun cuando entre ellas están los Ags del CMH, de conocido poder inmunogénico si se administran a individuos genéticamente diferentes.

Durante la ontogenia se desarrolla un repertorio inmune en el cual un gran número de clones linfocitarios reaccionan contra una amplia variedad de Ags en el medio externo, a la vez que se hacen tolerantes -específicamente no reactivos- contra moléculas propias. No se conoce en forma cierta cómo ocurre esto y su estudio es uno de los objetivos fundamentales de la inmunología contemporánea.

Sean los que fueren los mecanismos en juego, éstos deben continuar operando en el mantenimiento prolongado del estado de tolerancia, ya que es probable la aparición de clones de linfocitos autorreactivos a lo largo de la vida adulta de un individuo.

Nossal (21) postuló una serie de posibilidades por las cuales un "clon prohibido" de linfocitos autorreactivos no reacciona contra estructuras propias (21). Estas son:

(a) delección de clones autorreactivos por contacto con Ags propios bajo circunstancias especiales, en algunos estadios vulnerables del desarrollo celular, o bien debido a la ausencia de las señales secundarias adecuadas que son requeridas para iniciar la respuesta;

(b) activación de una regulación negativa por parte de

células T supresoras específicas para un Ag o para el receptor antigénico sobre los clones autorreactivos;

(c) redes antiidiotípicas mediadas por Acs;

(d) bloqueo de receptores por versiones monovalentes, no inmunogénicas, de los Ags propios;

(e) secuestro de Ags propios y

(f) eliminación de la región V de genes cuyos productos son autorreactivos durante la evolución.

Muchos de estos mecanismos han sido propuestos para explicar la tolerancia inmunológica a componentes del organismo y la adquisición de capacidad para discriminar entre Ags propios y extraños. De todos, la posibilidad de un mecanismo supresor activo y la generación de Acs anti-idiotipos son dos hipótesis muy atractivas (22-26). Se comprobó que la manipulación de la red idiotípica permite suprimir o estimular una dada respuesta de autoanticuerpos (26). Estos resultados sugieren que los mecanismos regulatorios que gobiernan la reactividad contra lo propio se basan en influencias positivas y negativas sobre el sistema receptor-antireceptor de Ags propios específicos dentro de la red, a lo cual se ha llamado "red autoinmune" (26, 27).

Por su parte, la activación de células T supresoras y la creación de un estado de memoria T supresora es central para evitar respuestas autoinmunes indeseables. Sin embargo, las dos teorías más corrientes para explicar la regulación de la respuesta inmune no están tan desconectadas entre sí: La presencia de

células T supresoras dirigidas contra receptores de Ag sobre linfocitos T autorreactivos, o actividades supresoras que colaboran en la producción de Acs anti-idiotipo, son ejemplos de la relación estrecha entre ambos procesos (9).

Una hipótesis distinta a las propuestas por Nossal (21) surgió de los nuevos conocimientos sobre procesamiento y presentación de Ags por parte de las células accesorias o presentadoras (CPA) a linfocitos T restringidos por el CMH. El descubrimiento de los requerimientos para el procesamiento de Ags llevó a postular que las moléculas de clase II podrían unirse a fragmentos del Ag procesado antes de su presentación (28). Distintos grupos han observado que, efectivamente, péptidos de PM semejante provenientes del Ag se unen a moléculas de clase II (29) y son transportados a la superficie en forma de complejos bimoleculares péptido antigénico-Ag de histocompatibilidad. Estas evidencias dieron pie a una hipótesis muy atractiva en el campo de la autoinmunidad: La discriminación entre propio y no propio podría ocurrir en el paso de procesamiento antigénico. Sin embargo, se ha demostrado que las CPA pueden procesar y presentar sin discriminación un buen número de proteínas propias (30, 31) y consecuentemente la tolerancia por células T parece convertirse en la clave de la autoinmunidad (32).

Si bien las causas de la autoinmunidad no son del todo conocidas, los aspectos salientes de los desórdenes autoinmunes han sido muy estudiados y puede decirse que conforman un gran

espectro, desde aquellos que afectan a un órgano blanco, hasta las enfermedades en que las lesiones y autoAcs no están confinados a ningún órgano. En el centro de este cuadro, quedarían los desórdenes con lesiones localizadas pero Acs no específicos (33).

La presencia de autoAcs circulantes no debe tomarse como una señal inequívoca del establecimiento de una enfermedad autoinmune, inclusive, se ha postulado para algunos de ellos un rol detoxificador (34).

La capacidad para desarrollar Acs autoinmunes parece estar relacionada con la edad (35) y existe una estrecha dependencia o, al menos asociación, de factores genéticos y autoinmunidad (36). A este respecto, los medios por los cuales los alelos particulares del CMH podrían conferir susceptibilidad son hipotéticos y su conocimiento proviene de la comprensión de las funciones de los Acs de clase I y II en el curso de la respuesta. Así, los productos de ciertos alelos de clase I podrían compartir epitopes con algunos patógenos o predisponer para la infección por microorganismos que puedan iniciar una respuesta contra Acs propios. Alternativamente, la interacción con factores exógenos puede alterar la estructura de un Ag de clase I e inducir la respuesta (36). Con respecto a los Acs de clase II, se ha comprobado que puede haber una expresión aberrante de estos Acs en células que normalmente no los portan, y así adquirir una función de células presentadoras de Ag (37, 38). Además, ciertas

moléculas de clase II podrían presentar Ags propios en forma más eficiente o, alternativamente, fallar en la supresión de respuestas contra lo propio (36).

Los fenómenos autoinmunes y las condiciones en que éstos ocurren hacen necesario poner énfasis en la distinción entre respuesta autoinmune y enfermedad autoinmune. En la primera el individuo produce Acs o células T dirigidos contra Ags propios, en la enfermedad autoinmune en cambio, las manifestaciones de la respuesta autoinmune contribuyen a la patogenia de la enfermedad. La cuestión, entonces, reside en determinar si la respuesta autoinmune -autoAcs y células autorreactivas- tiene un rol patogénico en la producción de lesiones tisulares observadas en estas enfermedades.

En este sentido, es conocida la participación de autoAcs en el deterioro de la función de células tiroideas en la enfermedad de Hashimoto, glóbulos rojos en la anemia hemolítica autoinmune, plaquetas en la púrpura trombocitopénica idiopática, células parietales del estómago en la anemia perniciosa, fibras musculares en la miastenia gravis y otras (33, 39-42). Además la acumulación de complejos inmunes también ha demostrado ser patogénica en enfermedades autoinmunes no específicas de órgano como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoidea (33, 39-42).

En cuanto a la respuesta celular, el infiltrado inflamatorio en un órgano blanco de la respuesta autoinmune es esencialmente

mononuclear y, aunque no infalible, el grado de infiltración ha sido tomado como señal de respuesta de hipersensibilidad retardada. Este cuadro se encuentra en la tiroiditis, anemia perniciosa, esclerosis múltiple y otros desórdenes autoinmunes localizados en un órgano (33, 39, 42).

A partir de la conclusión de que ciertos procesos autoinmunes eran patogénicos para el individuo y desencadenaban enfermedades autoinmunes, se intentó reproducir las lesiones en individuos normales por administración de Ags extraídos de ciertos órganos. Tales modelos deben ser sistemas reproducibles, con aspectos clínicos y patológicos consistentes, y suficientemente sólidos como para ser analizados exhaustivamente desde diversos puntos de vista -morfológico, genético, bioquímico e inmunológico. Los modelos más ampliamente usados al presente son de dos tipos: el primer grupo incluye las enfermedades autoinmunes relacionadas con inmunocomplejos como el lupus eritematoso sistémico que ocurre espontáneamente en algunas cepas de ratones bajo la influencia de su caudal genético (43). El segundo grupo está constituido por muchos sistemas experimentales conocidos como "enfermedades autoalérgicas experimentales" que se obtienen por inmunización con distintos tipos de sustancias específicas de órganos y preparadas de fuentes singeneicas, alogeneicas o xenogeneicas (44). Un tercer tipo de modelo ensayado en los últimos años es el de inducción de enfermedades autoinmunes en ratones naturalmente atímicos o timectomizados en

edad neonatal (45).

Si bien todos estos sistemas constituyen una aproximación, permiten comprender o postular mecanismos patogénicos de la respuesta autoinmune. Efectivamente, aun en su calidad de modelos incompletos, resultan de gran utilidad para enfocar aspectos puntuales de la respuesta, siempre que se acepte como premisa ser extremadamente cauto al generalizar o comparar con las situaciones reales.

1.2. Interacción del sistema inmune y el sistema neuroendócrino. Ramas aferentes y eferentes

Una vez conocidos los mecanismos básicos de la función del sistema inmune y comprendidos como una respuesta homeostática para mantener la integridad de células y órganos, no resulta del todo sorprendente que estas respuestas estén integradas a un sistema de control neuroendócrino. El alto grado de versatilidad entre el sistema nervioso central y el sistema inmune sugiere una red compleja que involucra diferentes tipos celulares y estructuras capaces de emitir y recibir señales bidireccionales. Estas consideraciones han sido el punto de partida para proponer una visión integradora de la inmunoregulación (46).

Así, la existencia de un nivel de regulación neuroendócrino implica que el sistema inmune es un órgano receptor que, tras

detectar Ags externos o propios modificados, puede trasladar al sistema nervioso central una información discriminada de los diferentes tipos de estímulos. Ante un estímulo tal, el cerebro o los mecanismos que de él dependen emitirán una serie de señales: El concepto de un sistema inmune cerrado a sus propios canales de activación y regulación, entonces, deja lugar a otro más avanzado -y complejo- de interacciones neuroendócrinas-inmunes (47).

Una vez aceptado este punto de la postulación, la pregunta que se impone es si realmente existen razones bioquímicas que expliquen esta interrelación. Blalock (48) propone tres posibles vías que dependen de: a) si las linfoquinas y los péptidos neuroendócrinos tienen funciones comunes, b) si las células del sistema nervioso y las del sistema inmune tienen receptores comunes para esas señales peptídicas y c) si existen hormonas peptídicas comunes a ambos sistemas.

La mayor parte de la investigación se ha dirigido, precisamente, a dilucidar esas cuestiones y, en este sentido, se han descrito evidencias que avalan las tres posibles vías de interacción (48-54).

En suma, los fenómenos regulatorios observados confirman una interacción bidireccional, en que las conexiones eferentes se refieren a la influencia nerviosa sobre el sistema inmune y las ramas aferentes incluyen la actividad de elementos del sistema inmune sobre el sistema neuroendócrino (47). Sintéticamente, en la dirección sistema nervioso→sistema inmune, entre las

evidencias se cuentan: la inervación de los órganos linfáticos (55), el control de metabolismo, proliferación y producción de Acs y factores por hormonas y neurotransmisores (52, 56-59), la predisposición a infecciones o enfermedades autoinmunes en estados de "stress" u otros trastornos nerviosos (60). Por otro lado, en el sentido inverso -sistema inmune→sistema nervioso-, algunos de los fenómenos observados son: Acs como imágenes internas de diversas hormonas en un posible desbalance de la red idiotípica (40, 61-65), mitógenos que modifican los canales iónicos de linfocitos T (66), timosinas y linfoquinas con actividades en diversas funciones nerviosas (7, 49-53, 67).

La cantidad y diversidad de descubrimientos y observaciones en estas áreas crece vertiginosamente y con ellos la necesidad de comprender estos mecanismos en el contexto fisiológico, así como de integrarlos con otros sistemas en el organismo.

Esta visión abarcadora será el punto de partida para la comprensión de la homeostasis así como de los procesos que conducen a la defensa del hospedador o a la aparición de lesiones inmunopatológicas.

2. FUNCION CARDIACA. REGULACION POR EL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO Y OTROS MECANISMOS

El corazón, en virtud de la actividad contráctil de sus

paredes musculares, impulsa sangre a través del organismo y, de esa forma, participa activamente en el aporte de nutrientes, remoción de desechos y, en general, transporte de hormonas, factores inmunológicos y otras sustancias regulatorias entre diversas regiones del cuerpo. Todas estas funciones dependen de esa estructura muscular cavitada y provista de válvulas, que trabaja como una bomba.

Tanto en su estructura como en la función, el músculo cardíaco es mucho más complejo que el músculo esquelético. El control de la actividad contráctil, por ejemplo se realiza mediante un sistema capaz de modular su función propulsora para adecuarse a las demandas del organismo (68).

La capacidad del músculo de funcionar como un transductor mecánico-químico y, a la vez, controlar intrínsecamente esa actividad según las demandas externas, depende de una estructura organizada de proteínas contráctiles (69). Estas proteínas, cuando se ensamblan "in vitro", exhiben propiedades que reflejan los tres aspectos salientes de la contracción cardíaca: a) hidrolizan ATP y así son capaces de liberar energía, b) observan cambios en sus propiedades físico-químicas que, asociados con la hidrólisis de ATP, son manifestaciones del desarrollo de tensión y acortamiento en el músculo intacto y c) sus interacciones están sujetas al control por iones calcio de tal forma que acoplan la excitación de la superficie celular al comienzo de la contracción (69, 70).

El músculo cardíaco, entonces, ejerce él mismo ambas funciones -contracción y regulación de la contracción- a través de mecanismos musculares especializados. Más aun, el impulso excitatorio que activa al miocardio es iniciado y propagado por células musculares especializadas y no por células nerviosas: La inervación del corazón no participa directamente en estos procesos sino que desempeña una tarea de modulación, al aumentar o disminuir diversos aspectos de la función cardíaca (71).

El corazón de mamíferos recibe inervación del sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático. Estos nervios modulan actividades cardíacas tales como el automatismo -nódulos sinoauricular y aurículoventricular-, conducción del impulso cardíaco y fuerza de contracción de aurícula y ventrículo. En todos los mamíferos estudiados, se ha comprobado una densa inervación autónoma de nódulos y aurículas, mientras que el miocardio ventricular presenta una regular inervación simpática y escasas fibras parasimpáticas (72).

Mediante técnicas histoquímicas y por ensayo directo del contenido de neurotransmisores, se pudo determinar la presencia de fibras nerviosas simpáticas en nódulos y aurículas que, en la mayoría de los mamíferos, son más abundantes que en ventrículo (73, 74). Con respecto a la distribución de fibras parasimpáticas, el nódulo sinoauricular presenta la mayor densidad de inervación vagal y, en orden decreciente, se ubican las aurículas derecha e izquierda, músculos papilares, ventrículo

derecho e izquierdo, con preferencia del tejido de conducción sobre el miocardio ventricular (75, 76).

En condiciones normales, las fibras nerviosas simpáticas realizan descargas continuas, a baja velocidad, que mantienen la fuerza de contracción ventricular en un 20 % por encima del valor basal sin estimulación: Cuando la estimulación simpática es máxima, el aumento llega aproximadamente al doble del valor normal (77).

La estimulación máxima parasimpática, por otro lado, disminuye la fuerza de contracción en un 30 % y resulta así un control sobre la actividad simpática (78, 79).

Además de los mecanismos regulatorios vinculados con filamentos finos y gruesos y calcio -inherentes a la célula miocárdica- y los dependientes del sistema nervioso autónomo, existen otras vías de modulación de la actividad contráctil que, si bien son secundarias, adquieren importancia en ciertos procesos patológicos.

Estas formas alternativas de regulación están relacionadas con cambios en el entorno iónico -intercambios sodio-calcio (80) y sodio-hidrógeno (81)- y con el metabolismo oxidativo en general (82-85). En los últimos años se ha hecho especial hincapié en las alteraciones metabólicas que involucran a distintos productos de oxidación del ácido araquidónico (AA), en parte por su participación en procesos inflamatorios o isquémicos (86, 87). Los párrafos siguientes se refieren a la participación del

sistema nervioso autónomo -adrenérgico y colinérgico- y los metabolitos del AA en la regulación de la función cardíaca.

2.1. Sistema adrenérgico. Receptores β adrenérgicos

Las catecolaminas, a través de receptores α y β adrenérgicos, modulan una variedad de respuestas fisiológicas en el corazón. La unión de sustancias endógenas -norepinefrina y epinefrina- a receptores adrenérgicos específicos ubicados en la membrana plasmática de la célula miocárdica preceden al aumento de la frecuencia y tensión cardíacas (77).

Los primeros aspectos estudiados fueron la inervación simpática del corazón y los efectos de su estimulación brevemente descriptos en la sección anterior- pero, recién en 1975 fue posible medir directamente las propiedades de los receptores β adrenérgicos en corazón de perro (88). Más tarde, estos estudios con ligandos radioactivos permitieron su identificación en otras especies (89-92). Del mismo modo, se determinó la presencia de receptores α adrenérgicos en corazón de varios mamíferos (93-95) a los cuales también se asocia con efectos estimulatorios de la contractilidad, por caminos transduccionales diferentes (77, 96).

Lands y col. (97) propusieron la existencia de dos subtipos de receptores β adrenérgicos, llamados β_1 y β_2 , definidos por sus afinidades relativas por epinefrina y norepinifrina. Los

receptores β_1 tienen aproximadamente la misma afinidad por las dos catecolaminas mientras que en los β_2 la afinidad por epinefrina es mayor que por norepinefrina. Actualmente existe una gran variedad de drogas con selectividad para estos subtipos (98). Ambos, β_1 y β_2 están presentes en el corazón de mamíferos, aunque su proporción relativa y distribución en las distintas regiones del miocardio es variable según las especies (99-102). Minneman y col. (99) sugirieron una relación de 83 % de β_1 y 17 % de β_2 en rata y Bryan y col. (103) postularon que en rata, cobayo y conejo sólo los β_1 median las respuestas de tensión y frecuencia, no así en gato, perro y hombre (104, 105).

2.1.1. Mecanismo de activación y su relación con la función contráctil

Los receptores β_1 y β_2 tienen mecanismos comunes de activación con estimulación de adenilato ciclasa que cataliza el pasaje de adenosina 5'-trifosfato (ATP) a adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), segundo mensajero en todos los tejidos examinados hasta el presente (106).

El AMPc regula los procesos metabólicos, eléctricos y mecánicos del miocardio, en su mayor parte, a través de la activación de proteínas kinasas dependientes de AMPc. Estas enzimas catalizan la fosforilación de varias enzimas como fosforilasa kinasa y glucógeno sintetasa que estimulan la

glucólisis (107) u otras relacionadas con el acople excitación-contracción que incluyen a las enzimas involucradas en flujos iónicos a través del sarcolema y retículo sarcoplasmático. La fosforilación de calcio ATPasa, responsable de la captación de calcio del citoplasma durante la relajación, y fosfolamban, regulador de este sistema transportador, conforman un mecanismo de control del acople excitación-contracción, mediado por AMPc (108).

Así, la unión de un agonista β adrenérgico a su receptor en la superficie externa de la célula se transforma en una señal intracelular -la acumulación de AMPc- a través de un sistema efector: El acople funcional de ambos -receptor y efector- depende de una de las llamadas proteínas transductoras o proteínas G (109), dependientes de nucleótidos de guanina.

Los sistemas de transducción de estímulos externos en los que participa la adenilato ciclasa están compuestos, entonces, por tres componentes: El receptor, la proteína regulatoria y el componente catalítico (Figura 1).

Existen dos tipos de actividades sobre la enzima o unidad catalítica C, una estimuladora, mediada por la proteína G_s y otra inhibitoria, mediada por G_i . Como ya vimos, los receptores β adrenérgicos son ejemplos de la primera actividad, mientras que los receptores colinérgicos muscarínicos (110) y los α_2 adrenérgicos (111) son algunos de los que median la inhibición de la enzima. Se conocen al presente numerosos ejemplos de

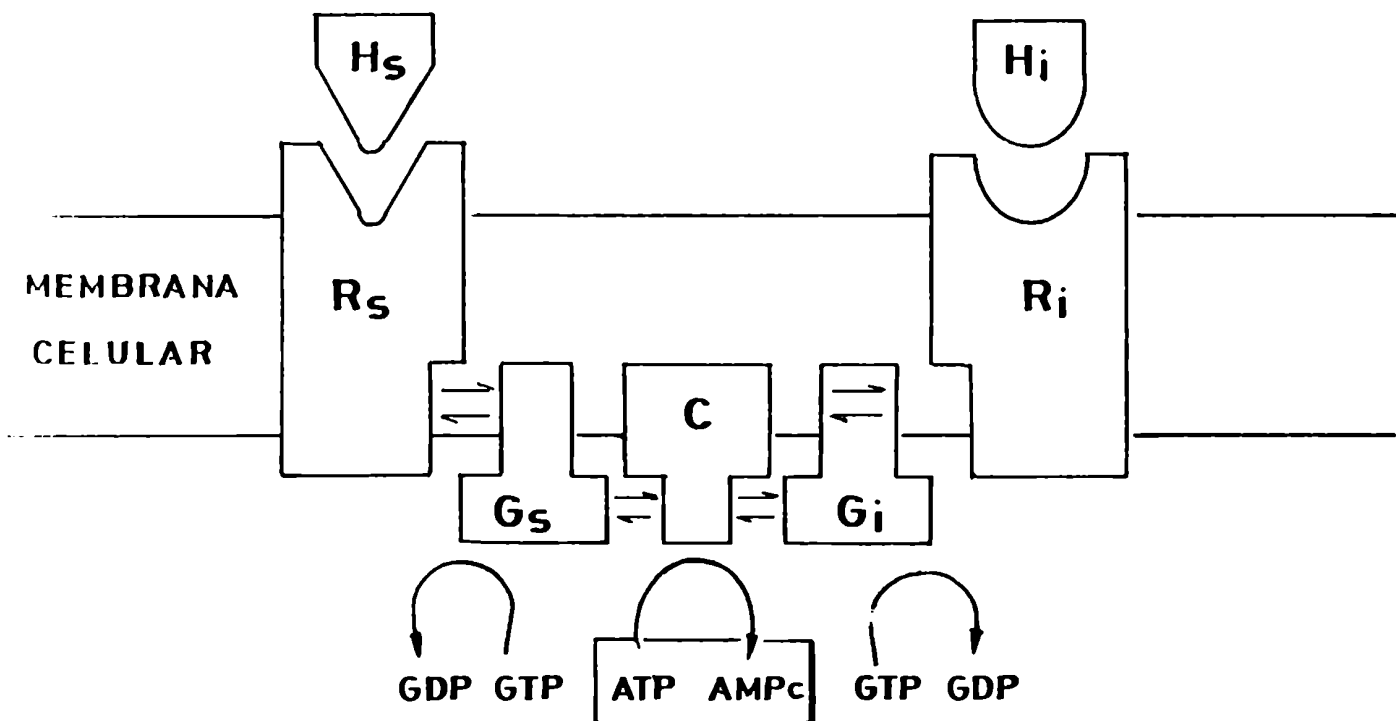


Figura 1: Modelo esquemático del sistema adenilato ciclasa sensible a hormonas. ATP, adenosina trifosfato; C, unidad catalítica; AMPc, adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico; GDP, guanosina 5'-difosfato; GTP, guanosina 5'-trifosfato; H, hormona; N, componente regulatorio dependiente de nucleótidos de guanina; R, receptor; i, inhibitorio; s, estimulador. Tomado de Stiles G. L. y col. (128).

receptores -de hormonas peptídicas, otros neurotransmisores, estímulos y factores diversos- acoplados a la adenilato ciclasa mediante las proteínas G_s o G_i (112).

Tanto G_s (113) como G_i (109, 114) han sido aisladas y purificadas. Ambas presentan una estructura heterotrimérica, con subunidades $\alpha\beta\gamma$ que migran en gel de poliacrilamida/SDS, en el caso de G_s , a 42 y 52 kDa las subunidades α (113), a 35 kDa la β (113) y a 6 a 10 kDa la subunidad γ (109). Las subunidades α son ADP-ribosiladas por la toxina del cólera (115), se disocian del holocomplejo luego de la activación (116) e hidrolizan GTP (117).

Así, los receptores β adrenérgicos -ambos subtipos- forman parte, junto con los receptores muscarínicos y el de rodopsina, de una familia de receptores acoplados a sistemas transduccionales que involucran a proteínas regulatorias dependientes de nucleótidos de guanina (118).

Los receptores beta y muscarínicos comparten una serie de características, no sólo funcionales - mecanismos de transducción- sino también estructurales, éstas últimas en estrecha relación con la actividad biológica de dichos receptores (119, 120).

Ambos presentan una estructura de α hélice con siete dominios transmembrana, donde ocurre el mayor porcentaje de homología en la secuencia aminoacídica; una porción extracelular y otra intracelular. La parte exterior como la citoplasmática

compuestas por cuatro fragmentos hidrofílicos con el grupo carboxilo terminal hacia el interior celular (118). La región extracelular presenta sitios de N-glicosilación y puentes disulfuro, en tanto que la intracelular tiene sitios de fosforilación -y regulación- por kinasas específicas (121-123) así como también de reconocimiento y acople con proteínas G (118).

2.1.2. Regulación de la función efectora

La unión de los agonistas beta adrenérgicos a su receptor lleva a la activación de la adenilato ciclasa: El hecho de que éste no sea el caso de los antagonistas sugiere diferencias fundamentales en la interacción de los primeros y los segundos con el receptor.

Al respecto, se han postulado efectos de nucleótidos de guanina sobre la unión específica de agonistas (124): En ausencia de GTP o sus análogos no hidrolizables, las curvas de competencia de los agonistas son complejas y se ajustan mejor a modelos de dos tipos de receptores, de alta y baja afinidad. El agregado del nucleótido parece convertir todos los receptores de alta afinidad en receptores de menor afinidad.

Este hecho, que podría parecer paradójico, encierra sin embargo la clave de la regulación del sistema: Los agonistas, gracias a su capacidad única de inducir, reconocer o estabilizar

los estados de alta afinidad del receptor, establecen, de alguna manera, las condiciones para que éste interactúe con el sistema efector. Más aun, estos nucleótidos, requeridos para la activación de la adenilato ciclasa, secuencialmente vuelven el receptor a un estado de baja afinidad por el agonista y desactivación de la ciclasa, que aseguran el reinicio del ciclo (112).

El receptor (R) (Figura 2), representado como una proteína transmembrana glucosilada, se presenta en dos conformaciones, una, desocupado, con baja afinidad por la hormona (H) y otra, ocupado, de alta afinidad tanto por la hormona como por la subunidad α de la proteína G_s . Bajo la influencia del complejo hormona-receptor (HR) se facilita la disociación de G_s en α_{GTP} y $\beta\gamma$ con la consiguiente activación del efector (E) -en este caso la unidad C de la ciclasa- por α_{GTP} . El pasaje de GTP a GDP gracias a la actividad GTPasa de α es el cierre del ciclo, ya que, a continuación, se disocia el complejo HR, se desactiva el efector, se reasocian las subunidades α , β y γ y el sistema retorna al punto de partida.

Además de la regulación, por parte de la interacción receptor-neurotransmisor, de la función de la adenilato ciclasa,

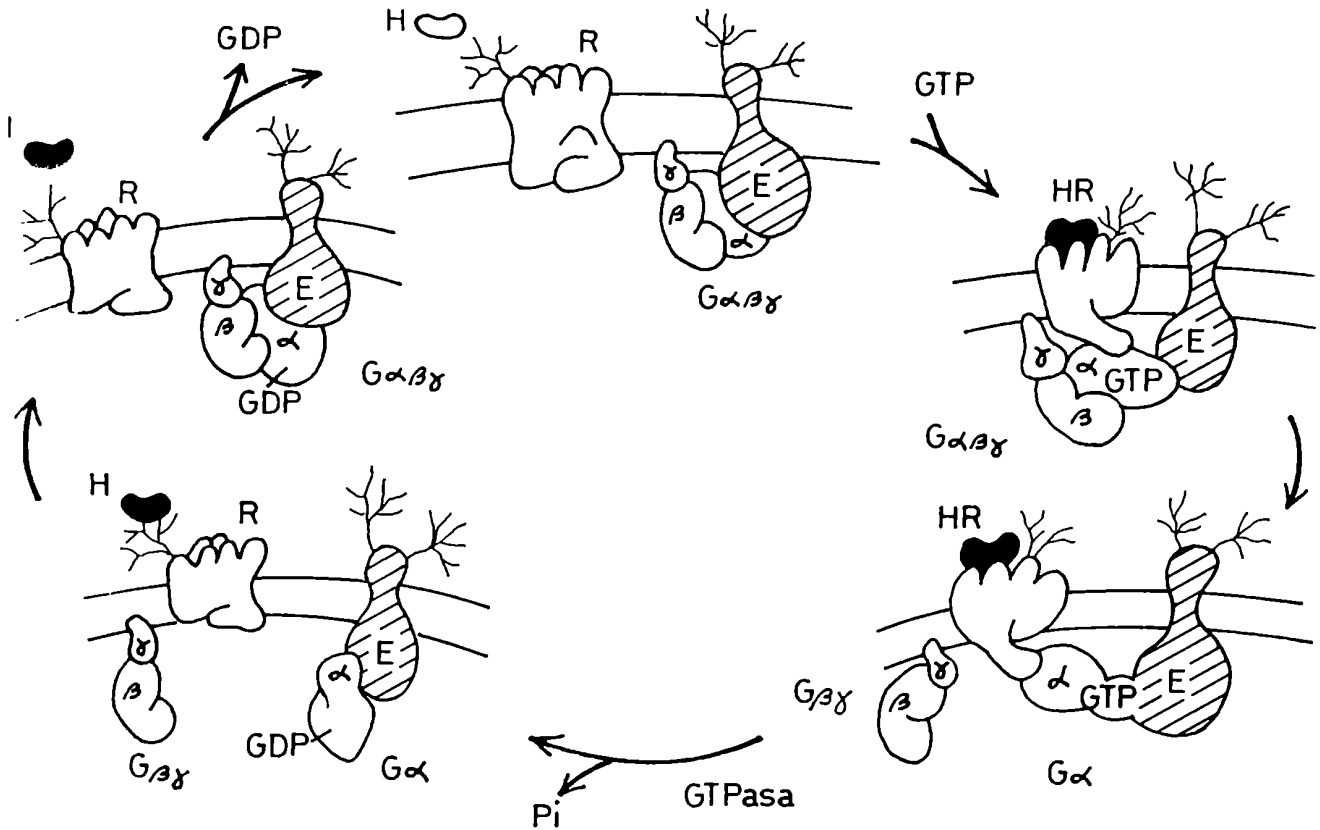


Figura 2: Rol de las proteínas G en la regulación de la función efectora mediada por un receptor. Este esquema está basado en los datos de estimulación hormonal de adenilato ciclasa, pero también es aplicable a la inhibición hormonal y, muy probablemente, a la regulación de otras funciones efectoras mediada por proteínas G. H, hormona; R, receptor; E, efector; G, proteína transdutora. (Ver explicación en el texto). Tomado de Birnbaumer L. y col. (112).

factores -regulación heteróloga. Estos dos mecanismos difieren en que, mientras la desensibilización homóloga involucra el secuestro de receptores, fuera del alcance de la ciclasa (125); la desensibilización heteróloga se relaciona con la fosforilación de receptores, sólo en parte mediada por AMPc (126, 127).

Estos mecanismos de regulación se han descrito en algunas enfermedades y se los relacionó con el uso de ciertas drogas, estados hormonales, envejecimiento, crecimiento, etc. (128).

2.2. Sistema colinérgico: Receptores colinérgicos muscarínicos

La disponibilidad de ligandos marcados radioactivamente, que se unen al receptor muscarínico con alta afinidad, ha permitido la identificación de los receptores muscarínicos en el corazón. Así se ha comprobado que la densidad de los mismos en ventrículo es aproximadamente un 20 % de la de aurícula, y dentro de ellas, la derecha presenta una población algo mayor que la izquierda, en diversos mamíferos estudiados (129).

Se han descrito tres subtipos, diferenciables por su capacidad de unir antagonistas como la pirenzepina y otros (130, 131). Los receptores muscarínicos cardíacos fueron

glándulas exócrinas, los segundos (131). Existen dos variantes más de estos receptores, los M_4 y M_5 , obtenidos por expresión de cDNA clonado, aun no resueltas farmacológicamente (133).

2.2.1. Relación de los mecanismos de activación con la función cardíaca

La activación de los receptores M_2 cardíacos causa un efecto inotrópico negativo, que se atribuyó durante mucho tiempo a una combinación de dos efectos: un aumento en la conductancia al potasio (134) y una disminución del influjo lento de calcio (135). Estudios realizados en células de nódulo sinoauricular de conejo con técnicas de "patch-clamp" sugirieron que la acetilcolina (ACh) induciría el flujo de potasio a través de la activación de un canal específico (136). Este canal, pudo comprobarse, está acoplado al receptor M_2 a través de una proteína G (137, 138) y su activación no es un fenómeno mediado por segundos mensajeros (139). La activación de los receptores muscarínicos cardíacos genera, junto con el efecto descrito sobre flujos iónicos, una serie de señales que incluyen la disminución de la acumulación de AMPc (140), el aumento de GMPc (141) y la hidrólisis de fosfoinosítidos (142).

heterotrimérica, contiene subunidades α_1 que migran con PM en un rango de 39 a 41 kDa, distintas de α_2 (144) y con capacidad de ser ADP-ribosiladas por la toxina pertussis. La toxina bloquea el efecto inhibitorio de los agonistas muscarínicos sobre la ciclase (110), con una inhibición simultánea de la actividad GTPasa de α_1 (145).

La participación de los bajos niveles de AMPc inducidos por agonistas muscarínicos en la contractilidad es a diversos niveles: Se ha demostrado que éste está involucrado en la regulación de la corriente lenta de calcio (146) por ACh, así como también en la reducida fosforilación de la proteína C del filamento grueso -involucrada en el efecto inotrópico positivo de los agonistas beta adrenérgicos- (147) y de fosfolamban, proteína asociada al transporte de iones calcio del retículo (148).

En cuanto a la estimulación de guanilato ciclase, mediada por los agonistas muscarínicos, se desconocen los mecanismos de regulación, e incluso, existe gran controversia respecto del rol del GMPc como segundo mensajero de la actividad muscarínica (149) en parte debido a que los efectos de los agonistas no pueden reproducirse con análogos del nucleótido ciclico (150) en ventrículo. Sin embargo, en aurícula pudo demostrarse la inhibición del influjo de ^{45}Ca por parte de los derivados de

defosforilación de proteínas contractiles (152): En especial la troponina I, cuyo grado de fosforilación se ha sugerido como uno de los mecanismos de regulación durante la diástole, parece estar asociada con una sensibilidad aumentada al calcio por parte de las miofibrillas (153) en contraste con la reducción en la sensibilidad al calcio y estimulación de la ATPasa por calcio que median los agonistas beta adrenérgicos (154).

La dificultad para establecer mecanismos que relacionen niveles de nucleótidos cíclicos y contractilidad ha dado lugar a considerar la hipótesis de una relación recíproca entre AMPc y GMPc -hipótesis del "yin-yang"-, si bien ésta no es totalmente aplicable al corazón de mamíferos (155).

2.2.2. Regulación de la actividad muscarínica

En estrecha similitud con lo referido antes sobre el sistema receptor beta-efector, el sistema colinérgico muscarínico tiene diversos mecanismos de regulación que le permiten modular la actividad muscarínica en ciertos estados patológicos, el hipertiroidismo y el estado diabético son dos buenos ejemplos (156, 157). A la desensibilización -regulación negativa- de receptores en presencia continua de los agonistas (158), se suman los mecanismos intrínsecos del sistema receptor-transductor-efector.

Con respecto a este punto existen varios sitios de

regulación en el sistema. Se ha sugerido que el receptor -sus características estructurales y semejanzas con el receptor beta, comentadas en la sección 2.1.1.- se presenta en tres conformaciones, super alta, alta y baja afinidad, que dan como resultado una población heterogénea cuya "afinidad promedio" es modificable por nucleótidos de guanina, fenómeno que está íntimamente relacionado con G_i (159).

Recientemente se ha demostrado, mediante análisis de las curvas de desplazamiento con agonistas y antagonistas y posterior ajuste de los resultados a diferentes modelos, que se trata de un receptor en dos estados, de alta y baja afinidad, con y sin cooperatividad entre ellos respectivamente (132).

El acople receptor-efector también está regulado por cationes monovalentes (143) y en ciertos casos, divalentes (160); condiciones de oxidación del medio (160), estado de fosforilación del receptor (122) y otros factores (161).

La regulación del sistema colinérgico muscarínico cardíaco tiene muchos puntos de coincidencia con el sistema beta adrenérgico: La figura 2 de la sección 2.1.2. se puede adaptar a los receptores muscarínicos con la subunidad α_i en lugar de α_s . Si bien, en general, funcionan de manera similar, este ciclo se modifica algo en el caso de G_i precisamente, en el paso en que los receptores -muscarínicos- cambian su estado de alta a baja afinidad: Esta transición ocurre con GTP en concentraciones diez veces mayores que con GDP, en el caso de G_s (162), mientras que

GDP es igualmente efectivo que GTP, si se trata de G_i (132). Dicha observación sugiere que habría dos fenómenos simultáneos: El cambio de conformación del receptor y su separación del sistema luego de la formación del complejo α_i -GTP -efector.

2.3. Leucotrienos como moduladores de la actividad cardíaca

El ácido araquidónico (AA) juega un rol central en diversos sistemas biológicos de control, a través de sus derivados oxigenados: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y otros. El AA se halla, en su mayoría, esterificado en el carbono β de fosfolípidos (163) y su disponibilidad depende de la actividad de la enzima fosfolipasa A2, presente en la mayoría de los tejidos estudiados, inclusive en corazón (164). El AA liberado por la fosfolipasa A2 es oxidado a través de dos vías: Una, es la de la enzima ciclooxigenasa, que da lugar a prostaglandinas y tromboxanos; la otra, requiere la actividad de un grupo de enzimas, las lipoxigenasas, y es responsable de la producción de leucotrienos (LT) y otros compuestos relacionados (Figura 3).

Los leucotrienos son una familia de sustancias biológicamente activas derivadas del metabolismo del AA vía 5-lipoxigenasa (166). e incluyen la sustancia de reacción lenta de

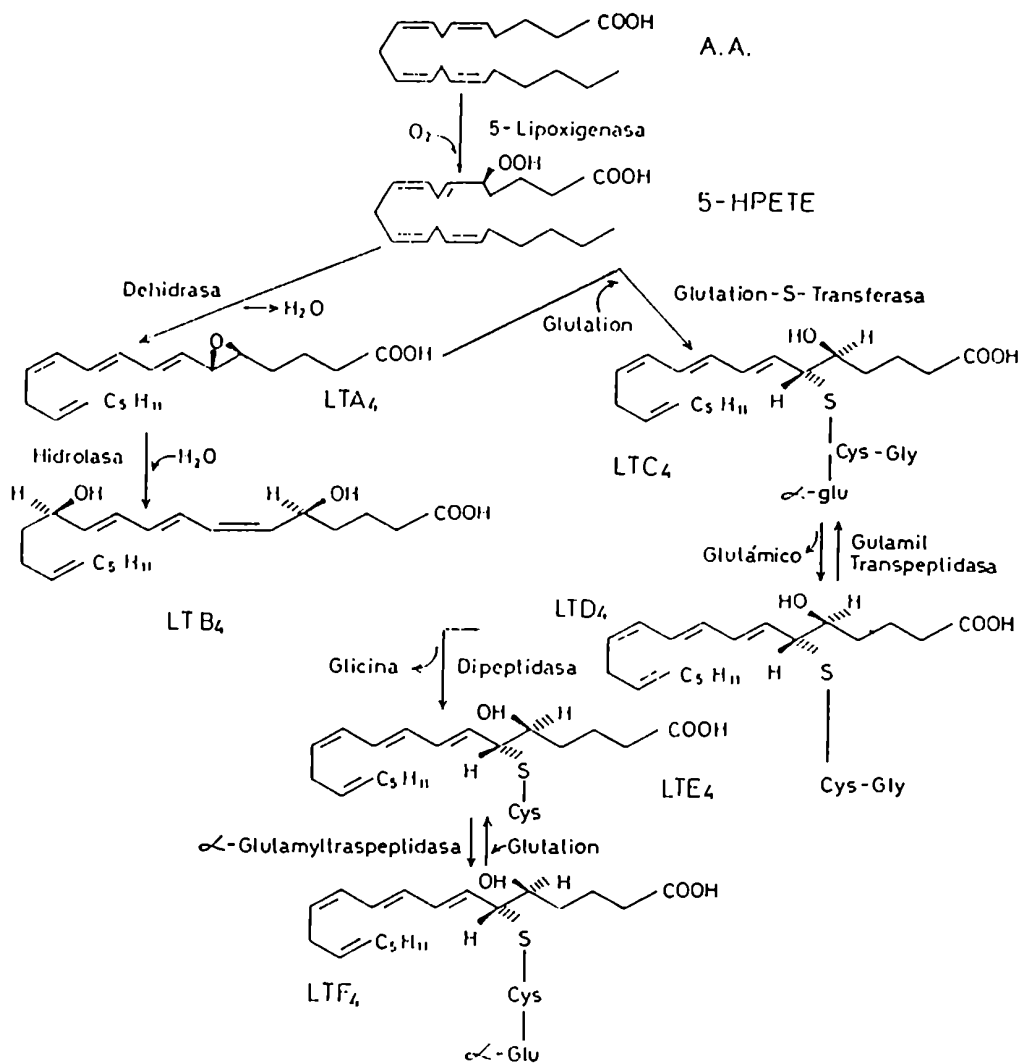


Figura 3: Formación de leucotrienos a partir de ácido araquidónico iniciada por la acción de la 5-lipoxigenasa. 5-HETE, ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico; 5-HPETE, ácido 5-hidroxiperoxi-eicosatetraenoico; LT, leucotrieno.

función cardíaca, el tono vascular y la microcirculación (169, 170), su actividad adquiere importancia en ciertos estados de hipersensibilidad o anafilaxia en los que el corazón es el principal órgano blanco y la descompensación cardíaca, la causa de fallo irreversible y muerte (171, 172). En este sentido, se han observado alteraciones en la función cardíaca -disritmias, fallas contráctiles- en estados de anafilaxia sistémica (172). Alteraciones comparables pudieron reproducirse mediante la administración cardíaca o sistémica de SRL-A (173) y posteriormente de LT purificados (170, 174, 175).

2.3.1. Efectos de LTC₄ y LTD₄ sobre la actividad cardíaca

En estudios de perfusión "in vitro" se comprobó una disminución de la contractilidad, con un efecto inotrópico negativo del LTC₄ que no era debido a vasoconstricción coronaria (170, 176).

Por otra parte, en estudios directos sobre preparaciones de miocardio humano y de cobayo conducidas eléctricamente -aurícula y ventrículo- se observó un efecto depresor directo de los cisteinil LT (174), con un orden de potencia LTD₄ > LTC₄ > LTE₄ (177).

Estos fenómenos descriptos en modelos "in vitro" también fueron confirmados "in vivo": Los efectos vasoconstrictores del LTD₄ se vieron acompañados por reducción de la contractilidad,

ritmos ventriculares ectópicos y trastornos de la conducción en rata y cerdo (178-180).

En ratas, los efectos depresores fueron bloqueados con un antagonista de leucotrienos, el FPL 55712, pero no por inhibición enzimática de la ciclooxigenasa con indometacina (175).

En cobayos, en cambio, la indometacina también bloquea los efectos de LT, lo cual sugiere una activación de la vía ciclooxigenasa por parte de los LT liberados (170, 175).

La liberación de LT por preparaciones de corazón sensibilizado luego del desafío antigénico fue una de las primeras evidencias para postular su producción "in situ" (169), aunque ésta podía depender de otras células presentes en el órgano -endoteliales, macrófagos. Recientemente, en cultivos de miocardiocitos se ha observado la liberación de LTC₄ y su posterior conversión enzimática a LTD₄ (181, 182). Estos resultados confirman y dan sustento a la postulación de los leucotrienos como cofactores que modulan la actividad cardíaca.

3. FENOMENOS INMUNOPATOLOGICOS QUE COMPROMETEN AL MIOCARDIO

El miocardio puede verse afectado por un gran número de procesos -inflamatorios, degenerativos, neoplásicos- con diversos grados de significación clínica. Estas afecciones o cardiomiopatías se han clasificado en primarias o secundarias:

Las primeras incluirían aquellos trastornos idiopáticos metabólicos, familiares, nutricionales- mientras que a las segundas corresponderían los fenómenos generalizados con compromiso miocárdico -infecciones, trastornos nerviosos, enfermedades degenerativas y otros (183). Sin embargo, esta clasificación es controvertida, ya que muchos autores incluyen en las cardiomiopatías primarias a las de etiología generalizada o específica (184). Desde un punto de vista práctico, ya que se conoce poco acerca de las causas, parece acertado clasificar las cardiomiopatías en dos tipos fundamentales: Unas asociadas con procesos inflamatorios y otras, no (185). El primer grupo consistiría en las miocarditis por agentes infecciosos, las asociadas con enfermedades sistémicas y las de causa desconocida; mientras que en el segundo, se cuentan las asociadas a desórdenes metabólicos u hormonales, hereditarios, agentes físicos y químicos y desconocidos. Las miocarditis virales, chagásica y bacterianas son algunos ejemplos de procesos inmunopatológicos que comprometen al miocardio y alteran en forma aguda o crónica la función cardíaca.

3.1. Cardiomiopatía chagásica

La enfermedad de Chagas es una parasitosis crónica. Su manifestación clínica más importante es el desarrollo tardío de una miocarditis crónica y, mucho menos frecuente, de una

miocarditis aguda precoz. Debido a la alta frecuencia de esta miocarditis crónica, la enfermedad de Chagas constituye uno de los problemas sanitarios más graves que afectan a la población adulta de la República Argentina y, en grados diversos, a casi todos los países americanos (186).

El agente etiológico es el Trypanosoma cruzi (187), parásito intracelular obligado con una marcada preferencia por parasitar fibras musculares estriadas, incluso miocitos cardíacos (188). Se desconoce el mecanismo delmiotropismo y, en cuanto a los procesos de reconocimiento y penetración celular, se propone a los sitios de adhesión de glicoproteínas y receptores de fibronectina como posibles candidatos (189, 190).

Una de las características más sorprendentes de la patología de la cardiomiopatía chagásica es la falta de correlación entre la severidad y extensión de los procesos inflamatorios y la total -o casi total- ausencia de parásitos intracelulares en el corazón (186). Como en las infecciones virales, el T. cruzi es capaz de invadir las células miocárdicas y desaparecer sin dejar huella, luego de gatillar un mecanismo inmunopatológico: Las evidencias de procesos inmunopatológicos en la enfermedad de Chagas son numerosas. Además de la reactividad sérica contra Ags cardíacos (191) y la presencia en el corazón de depósitos de inmunoglobulinas y complemento (192), se han descrito efectos de IgG de pacientes chagásicos en la actividad auricular, asociados con sistemas de transducción a través de membrana (193, 194). A

su vez, los linfocitos T4 de pacientes chagásicos tienen actividad estimuladora cardíaca (195) y los linfocitos citotóxicos de ratones endocriados infectados crónicamente pueden lisar miofibrillas de corazón singeneico (196). Esta actividad celular específica se demostró en modelos animales (197) y en humanos (198) y en posteriores estudios ultraestructurales se observó la interacción de linfocitos con células miocárdicas alteradas (199). La demostración más convincente del rol de la respuesta inmune celular en la patogenia de la cardiopatía chagásica, sin embargo, estuvo dado por el éxito al transferir autoinmunidad con células chagásicas a ratones normales y el posterior desarrollo de miocarditis (200). Por último, el suero de pacientes chagásicos cardiópatas -y no el de asintomáticos- precipita una proteína de PM 25 kDa del T. cruzi (201). Estas observaciones avalan fuertemente un mecanismo inmunopatológico que involucra a un número restringido de epitopes sarcolemales y del parásito. A esta diversidad de fenómenos directos sobre la célula miocárdica se agregan otras alteraciones funcionales ocasionadas por el sistema nervioso autónomo afectado por la infección chagásica (202).

3.2. Miocarditis virales

Un tipo de cardiomiopatía, la cardiopatía dilatada idiopática (CDI), es frecuentemente asociada con infecciones

virales. Los virus Coxsackie tipos B1-5 parecen ser la causa predominante de miocarditis viral en el hombre (203) y menos frecuente, otros enterovirus de los grupos Coxsackie A y ecovirus (204). Muchas de las infecciones por Coxsackie B son subclínicas, pero pueden llevar a una falla aguda del corazón o a una variedad de arritmias (204). A propósito del seguimiento, la falta de marcadores virales apropiados y el corto periodo de la actividad viral hacen difícil seguir el curso de la enfermedad, tanto como la identificación de los pacientes -5 a 12 %- que evolucionan a una CDI. Las miocardiopatías virales, como la chagásica, parecen tener en común un componente inmunopatológico: En el caso de las primeras, se propuso que tras la infección viral del miocardio, un proceso autoinmune era el responsable de las lesiones cardíacas observadas en la CDI (205, 206). Inclusive se ha intentado relacionar las lesiones cardíacas con la respuesta inmune celular (206, 207); se han hallado infiltrados de células mononucleares en pacientes con CDI, disfunción de la subpoblación de células T supresoras (206) y de células NK (208). Con el fin de conocer mejor estos mecanismos, se desarrollaron modelos experimentales en ratón en los que se comprobó la presencia de autoAbs dirigidos contra la isoforma cardíaca de la cadena pesada de miosina (209, 210) y de células T reactivas contra Ags cardíacos (211). Los modelos "in vitro" confirmaron estas observaciones al implicar a células T citotóxicas (212) y respuestas de hipersensibilidad retardada en el proceso (213).

Estas evidencias, así como las comentadas acerca de la miocardiopatía chagásica, sugieren la existencia de puntos de coincidencia y diferencias entre ambos mecanismos inmunopatológicos y dan sustento a la hipótesis de un proceso autoinmune que involucra principalmente al miocardio.

3.3. Otros fenómenos inmunes asociados con el miocardio

En las secciones precedentes se discutieron algunos aspectos del dano inmune en el miocardio que se desencadena con la entrada de ciertos agentes infecciosos. Existen otros desórdenes que afectan a este tejido como la enfermedad inflamatoria cardíaca después de infecciones con ciertas cepas de estreptococos (214) y luego de situaciones de injuria cardíaca - clínica o quirúrgica (215, 216). Con respecto a los procesos autoinmunes posteriores a una infección estreptocócica, se han detectado autoAcs reactivos contra el corazón en individuos con fiebre reumática que dan reacción cruzada con proteínas bacterianas (217, 218). La presencia de Acs contra corazón que se observa luego de un infarto de miocardio, intervenciones quirúrgicas y otras situaciones con daño de la célula miocárdica, no se ha podido asociar con un mecanismo inmunopatológico y además se observó que desaparecen en los períodos quiescentes (219).

Otros fenómenos inmunes que comprometen al miocardio son la

anafilaxia sistémica (87), el lupus eritematoso y otras enfermedades del colágeno (183, 184).

3.4. Modelos experimentales

Se han diseñado diversos modelos experimentales para estudiar los procesos inmunopatológicos que afectan al miocardio. Entre ellos, los de miocarditis virales (204, 209-211, 220) y de miocardiopatía chagásica (196, 221-225) han resultado de enorme importancia para postular la naturaleza autoinmune de estas cardiopatías.

Otro punto de vista para analizar este tema es el desarrollo de modelos de miocarditis autoinmune por inmunización con homogenatos de corazón o fracciones purificadas (219, 226-228). En este último grupo se inscriben algunos trabajos recientes que se basan en modelos de miocarditis autoinmune para compararlos o correlacionar con los mecanismos que operan en la cardiopatía chagásica (229, 230) y viral (231, 232).

Si bien estos modelos no son más que una aproximación, ofrecen la ventaja de tener algunas variables acotadas concernientes al agente infeccioso, y constituyen un punto de partida interesante para comprender un tema tan complejo como es la autoinmunidad.

4. OBJETIVOS DE ESTA TESIS

El desarrollo de modelos de miocarditis autoinmune constituye un punto de partida para la comprensión de los mecanismos inmunopatológicos operantes en otras miocarditis como la cardiomiopatía chagásica o viral.

En virtud de esta premisa y de los renovados descubrimientos acerca de la estrecha relación del sistema inmune con el resto de los sistemas del organismo, nos pareció interesante estudiar la posible vinculación de la respuesta inmune y la actividad cardíaca en un modelo de miocarditis autoinmune.

Los pasos seguidos fueron los siguientes:

Obtención de un modelo experimental adecuado que permita estudiar la respuesta inmune y la actividad cardíaca y la influencia de una sobre la otra.

Estudio de la capacidad de los Acs y células inmunocompetentes de interactuar específicamente con estructuras del miocardio comprometidas en la regulación de su función.

Comparación de los resultados obtenidos con otros modelos de miocarditis en que se describen posibles fenómenos de autoinmunidad.

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

1. ANIMALES

Se emplearon ratones macho de las cepas Albino Suizo provenientes del bioterio de la Academia Nacional de Medicina y BALB/c de la Comisión Nacional de Energía Atómica y ratas macho de la cepa Wistar criadas en el bioterio del CEFAPRIN y cobayos macho provistos por la Casa Izaguirre. Los ratones fueron utilizados cuando contaban entre dos y seis meses de edad. Las cepas fueron elegidas por su baja capacidad para desarrollar miocarditis espontánea, junto con una alta capacidad para descargar respuestas inmunopatológicas sobre el miocardio en desórdenes autoinmunes y en la infección con T. cruzi (223, 224, 229).

2. INMUNIZACIONES

Las inmunizaciones se llevaron a cabo entre ratones machos de la misma cepa según el siguiente esquema: Una primera inoculación por vía subcutánea en distintos sitios de la región dorsal y un repique a los veintiun días en las mismas condiciones. Los ratones se sacrificaron a los 60 días de la primera inoculación.

Para la preparación de los antígenos se removieron los corazones y testículos de ratones de dos meses de edad, se cortaron en pequeños trozos y se homogeneizaron en una solución

salina tamponada (SST) a 4 °C con un Ultra Turrax a tres velocidades -baja, media y alta- durante 15 segundos en cada posición. Una vez homogénea la preparación, se separó una tercera parte de la misma, se la llevo a 80°C en un baño de agua y se la reunió con la otra porción no tratada, para ajustar la concentración de proteínas a 10 mg/ml. Esta suspensión se emulsionó con adyuvante de Freund Completo (AFC) (Sigma) que contenía 1 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis, mediante un dispositivo de dos jeringas acopladas a una aguja.

Los ratones fueron inoculados con 0,8 ml de la emulsión de homogenato de corazón (grupo I) o testículo (grupo II) o bien con un volumen igual de emulsión de solución salina en AFC (grupo III). Una serie de ratones de la misma edad se mantuvo sin inyectar y corresponde al grupo IV o "normales".

La inmunización se evaluó a través de la inmunofluorescencia de los sueros sobre cortes de miocardio realizados con un crióstato y el estudio histológico de las secciones de miocardio de animales de los cuatro grupos.

3. ESTUDIOS HISTOLOGICOS

Las muestras de músculo estriado de la pata y de corazón fueron fijadas en formaldehído tamponado al 10 % inmediatamente después de extraídos, incluidos en parafina, cortados y teñidos con hematoxilina-eosina. En todos los ratones se observó al menos

una sección de cada cavidad y una de músculo esquelético de la pata. De acuerdo al tamaño y distribución de los infiltrados, las lesiones fueron clasificadas como 1+, 2+ y 3+ y, según el grado de expansión y propagación, en focales y difusas.

En cada ratón se obtuvo una microfotografía de aurícula y otra de ventrículo con un aumento de 160 x. Estas fueron ampliadas a 18x24 en papel, sobre ellas se aplicó un retículo de 2x2 cm y se contaron las células linfomononucleares (CLM) en 16 de estos cuadrados elegidos al azar (64 cm²). Los resultados fueron expresados en CLM/64 cm². Estos estudios pudieron llevarse a cabo sólo en animales con miocarditis difusa debido a la dificultad para hacer un estudio semicuantitativo en el otro tipo de lesión.

4. INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA

4.1. Sobre cortes de tejido muscular estriado

Se investigó la presencia de anticuerpos reactivos contra corazón y músculo estriado en cortes obtenidos con crióstato: Se extrajeron los corazones y músculo de la pata delantera de ratones idénticos de dos meses de edad y se congelaron a -70 °C, luego se realizaron cortes con un micrótopo anexo a una cámara refrigeradora a -20°C, de un espesor aproximado de 6 a 8 µm. Una vez fijados a portaobjetos, fueron empleados en la reacción de

inmunofluorescencia.

Los sueros fueron estudiados individualmente en dos diluciones, 1/30 y 1/100, según técnicas convencionales (233, 234) usando un suero de cabra anti IgG de ratón marcado con fluoresceína (Sigma). Se colocaron los sueros diluidos en SST sobre los cortes y se incubaron en una cámara húmeda 45 minutos en las mismas condiciones que antes. Después de lavar tres veces con SST y una con agua bidestilada, se montaron con una solución de glicerina SST (9:1), se sellaron y se procedió a su observación con un microscopio Carl Zeiss de epiiluminación y con lámpara de Hg HBO 50.

4.2. Sobre cultivos primarios de miocardiocitos

Se realizaron cultivos primarios de miocardio a partir de fetos pre-término de ratas Wistar según la técnica de Simpson y Savion (235), en cubreobjetos de Leighton. El crecimiento adecuado de los cardiocitos fue confirmado por la existencia de células que latían rítmicamente. Las células de los cultivos primarios fueron cosechadas a las 72 horas y en algunos experimentos a los 7 días y utilizadas sin fijar, pudiendo detectar antígenos de membrana. El cultivo empleado contenía 40-80 % de células contráctiles y las restantes fueron identificadas por microscopía de contraste de fase como células endoteliales.

Los sueros estudiados fueron diluidos 1:10 y se empleó el

mismo antisuero que el descrito en 4.1., así como las técnicas descriptas bajo ese ítem.

4.3. Procedimientos para la absorción de los sueros

Algunas muestras de sueros fueron absorbidas con miosina de corazón bovino (gentileza del Dr. P. Cossio). Para ello, se incubaron 0,7 mg de miosina por ml de suero por una hora a 37°C y 48 horas a 4°C. Las absorciones con homogenatos de corazón se efectuaron por 1 hora a 37 °C y toda la noche a 4 °C en una relación de suero a homogenato de 1 a 9. Este último se preparó del mismo modo que para inmunizar y al cabo de la incubación se separó por centrifugación a 4 °C y 10.000 x g, 15 minutos.

5. MÉTODOS EMPLEADOS PARA EL FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACION DE POBLACIONES CELULARES

5.1. Preparación de las suspensiones celulares

Los animales se sangraron a blanco y se extrajeron los órganos linfáticos: timo, ganglios y bazo. Una vez limpios de grasa y otros tejidos, se homogeneizaron en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma) con un homogeneizador de vidrio y teflon y se filtraron por una malla de acero. Los globulos rojos se eliminaron mediante tratamiento hipoosmolar por veinte segundos ,

al cabo de los cuales se restableció el medio con RPMI-1640 y suero fetal bovino al 10 % (SFB) (Gibco). Las suspensiones celulares se centrifugaron a 200 x g, 10 minutos a 4°C y se lavaron dos veces más. Finalmente se contaron con una cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad por exclusión de Azul Tripán: En todos los casos se emplearon suspensiones con 95 % de células viables o más.

5.2. Remoción de células adherentes al plástico

Con el fin de eliminar las células con capacidad de adherirse a superficies de plástico, se incubaron 3.10^7 células en cápsulas de Petri de 60 mm (Falcon, California, USA) con 4 ml de medio RPMI-1640 y 10 % de SFB durante 1 hora a 37 °C en atmósfera de aire con 5 % de CO₂. Se recogieron las células no adherentes en suspensión y se repitió el procedimiento dos veces más (236). La ausencia de células adherentes en las preparaciones se verificó por medio de la tinción de un extendido con un reactivo comercial que detecta la actividad de esterases no específicas usando α -naftil-acetato como sustrato, Fast Blue RR como colorante y hematoxilina de Mayer como colorante de contraste (Sigma) (237). No se detectaron células esterase positivas en estas suspensiones.

5.3. Aislamiento de células adherentes

Se purificaron a partir de exudado peritoneal obtenido por lavado de esa cavidad con 5 ml de RPMI-1640. Las células se colocaron sobre cápsulas de Petri de 60 mm (10^8 /10 ml de medio) y se incubaron 1 hora a 37°C en atmósfera de aire con 5 % de CO₂. Las células no adherentes se removieron por lavado con medio de cultivo helado. El procedimiento se repitió tres veces. Para despegar las células adherentes se incubaron con medio helado que contenía lidocaína 12 mM. Luego de cinco lavados con medio helado, las células se recogieron y se lavaron cuatro veces a fin de eliminar la lidocaína. La pureza de la población, por tinción para α -naftil-acetato esterasa fue de un 90 % (238).

5.4. Purificación de células T

Las células T se aislaron de los ganglios linfáticos o del bazo y se separaron por pasaje a través de columnas de lana de nylon (239, 240). Antes de ser utilizada, la lana de nylon se hirvió en agua destilada durante 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente, procedimiento que se repitió cuatro veces con agua destilada y cuatro con agua bidestilada. Luego se dejó secar a 37 °C envuelta en gasa y por último se peinó cuidadosamente para deshacer los nudos. Las columnas se armaron en jeringas descartables de 10 ml con 0,6 g de lana, se lavaron

con 50 a 100 ml de SST con 5 % de SFB a 37 °C. Luego de estabilizar 1 hora a esta temperatura, se sembraron 8.10^7 células en 1 ml de SST, se dejó 45 minutos más a 37°C y finalmente se eluyeron las células y se lavaron dos veces con RPMI-1640.

La pureza de la suspensión, determinada en un ensayo de citotoxicidad con anti Thy 1.2. (New England Nuclear) y complemento (Gibco), fue mayor del 97 %.

5.4.1. Tratamiento con anti Thy y complemento

2.10^8 células se dispusieron en 0,5 ml de RPMI-1640 con 150 µl de un anticuerpo monoclonal anti Thy 1.2. diluido 1/100 (New England Nuclear, título 10^{-6}) y 500 µl de complemento de cobayo sin diluir (Gibco). Las células se incubaron 30 minutos a 37 °C con agitación cada 5 minutos, se lavaron tres veces y se contaron.

5.4.2. Tratamiento con anti L3T4 y anti Lyt 2.2. y complemento

2.10^7 células en 0,5 ml de medio RPMI-1640 se trataron con 200 µl de un anticuerpo monoclonal anti L3T4 (gentileza de la Dra. M.M. Bracco) o con un anticuerpo monoclonal anti Lyt 2.2. (Cederlane). Luego de 60 minutos de incubación a 4 °C se centrifugaron las células a 200 x g 10 minutos y se descartó el

sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 0,5 ml de complemento de conejo de baja toxicidad (Cederlane) y se incubó 1 hora a 37°C tras la cual se realizaron tres lavados y se contaron las células.

5.5. Purificación de células B

La obtención de una población enriquecida en células B se realizó por depleción de la población T con suero anti Thy 1.2. y complemento, de acuerdo al procedimiento descrito en 5.4.1., y remoción de las células muertas y polimorfonucleares a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque de densidad 1090 que se centrifugó a 400 x g 20 minutos. Finalmente, la interfase rica en células mononucleares se aspiró, se lavó tres veces con RPMI-1640 y se eliminaron las células adherentes al plástico según el método detallado en 5.1.

La suspensión final consistió en un 94 % de células B, identificadas con un anticuerpo antiinmunoglobulina de ratón marcado con fluoresceína (Miles-Yeda, Ltd.).

5.6. Obtención de sobrenadantes libres de células

Se prepararon sobrenadantes libres de células por incubación de $4 \cdot 10^7$ células linfáticas, controles o inmunes con trozos de aurículas o aurículas enteras en 1 ml de RPMI-1640. Luego de 30

minutos a 37°C, se retiraron las aurículas y se centrifugaron las células por 15 minutos a 500 x g. Los controles realizados con trozos auriculares solos y células inmunes solas se realizaron de la misma forma, así como también, los de células controles con concanavalina A (10 µg/ml).

6. AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES Y PURIFICACION DE LA FRACCION IgG

Las inmunoglobulinas totales fueron aisladas de sueros controles y autoinmunes por precipitación con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ según técnicas convencionales (241). Se realizaron dos precipitaciones sucesivas con la sal de amonio al 50 y al 33 % de saturación. Se repitió la última dos veces más, el precipitado se disolvió en agua destilada y dializó exhaustivamente contra tampón de fosfatos 10 mM a pH 8. El análisis inmunolectroforético indicó ausencia de albúmina y alfa y beta globulinas.

La fracción IgG del suero se purificó por cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa (Sigma) (242). Se dializaron 2 ml de suero contra tampón de fosfatos 10 mM, pH 7,7 y se sembraron sobre una columna que contenía 10 ml de resina previamente activada y estabilizada con el mismo tampón. La fracción IgG se eluyó con tampón de fosfatos 20 mM, pH 8. Se reunieron las fracciones que componían el primer pico de absorbancia a 280 nm y se concentraron por medio de un

concentrador del tipo Minicon B 15, para luego medir la concentración de proteínas por el método de Lowry (243) con seroalbúmina bovina como testigo. La fracción obtenida fue sometida a inmunolectroforesis en agarosa con un suero de conejo antisuero de ratón, observándose una única banda de precipitación correspondiente a IgG (244).

7. VALORACION DE LA ACTIVIDAD MECANICA

7.1. Preparación del tejido

Los estudios se realizaron sobre el miocardio auricular de ratones machos cuyos pesos oscilaron entre 20 y 40 g.

En todos los casos los animales se sacrificaron por decapitación con guillotina. Luego se les extrajo el corazón y, con el objeto de que las contracciones cardíacas eliminen la sangre contenida en las cavidades, se lo colocó algunos minutos en una solución de Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB) modificada (245), de composición: Na^+ 145 mM, K^+ 6,02 mM, Ca^{2+} : 1,22 mM, Mg^{2+} 1,34 mM, Cl^- 126 mM, HCO_3^- 25 mM, PO_4^{3-} 1,20 mM, SO_4^{2-} 1,33 mM y glucosa: 5,5 mM, convenientemente gaseada con una mezcla de 95 % de O_2 y 5 % de CO_2 . A continuación se separaron las aurículas de los ventrículos y por último se disecaron cuidadosamente.

Una vez aislado, el tejido se fijó con un hilo por un

extremo a un soporte tisular y por el otro a un transductor mecánico-eléctrico Statham modelo UC 3 - Gold Cell acoplado a un oscilógrafo inscriptor (SAN-EI 180) que permitió registrar la actividad contráctil del tejido cardíaco. El conjunto de tejido y soporte se sumergió en una cámara con 10 ml de KRB gaseada con 5 % de CO₂ en O₂ , a 30°C y pH 7,4.

Una vez montado el preparado, se aplicó una tensión basal de 350 mg mediante un dispositivo micrométrico y se dejó estabilizar el tejido durante 1 hora antes de comenzar con los experimentos.

En la figura 4 se muestra en forma esquemática el sistema experimental utilizado para registrar los parámetros de contractilidad.

7.2. Registro de la actividad contráctil

Al finalizar el periodo de equilibrio, se procedió al registro de los parámetros que determinan la actividad contráctil: a) la tensión contráctil isométrica (TCI), expresada en mg y que corresponde a las contracciones fásicas desarrolladas sobre la tensión de reposo aplicada externamente y seguidas de relajación b) la frecuencia de contracción espontánea (Fc) expresada en latidos / minuto. También se registró la actividad de aurículas conducidas eléctricamente a una frecuencia constante de 300 latidos por minuto, cercana a la de reposo. Las preparaciones fueron estimuladas con un electrodo bipolar y un

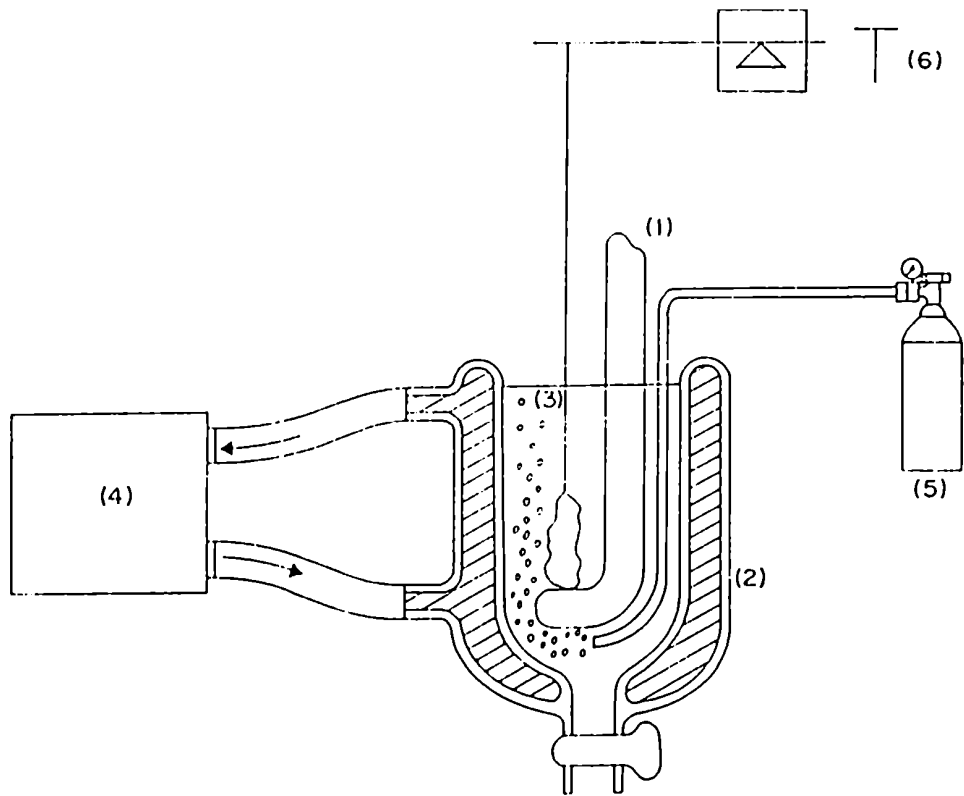


Figura 4: Disposición del tejido montado para el registro de la actividad contractil de las aurículas aisladas de ratón. 1) Soporte tisular, 2) cámara tisular, 3) solución de K. R. B., 4) bomba termostaticada a 30 °C, 5) fuente de carbógeno, 6) transductor de tensión.

estimulador Grass SK 4 con una duración del estímulo de 2 ms y una intensidad un 10 % por encima del umbral. Los efectos inotrópicos (dF/dt) se obtuvieron por registro de la máxima velocidad desarrollada de la tensión isométrica durante la estimulación a una frecuencia constante similar a la normal, condiciones óptimas para medir el inotropismo dentro del rango fisiológico de la relación tensión-frecuencia. Los valores absolutos para el dF/dt de las aurículas de ratón fueron de $4,3 \pm 0,3$ g/s (n=37).

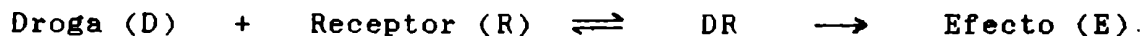
Las modificaciones de estos parámetros producidas por el agregado de células inmunes o anticuerpos se expresaron en valores absolutos o como porcentajes de cambio respecto de los registros controles tomados inmediatamente después del equilibrio y considerados como el 100 %. Los tiempos y condiciones usados fueron los óptimos para cada sistema experimental.

Las curvas concentración-respuesta fueron construidas según el método acumulativo descrito por Van Rossum (246) en los experimentos en que se evaluó la acción farmacológica de diversas drogas sobre los efectos de células o anticuerpos, las mismas se dejaron actuar 30 minutos antes del agregado de éstos.

7.3. Relación entre dosis y efecto

Las drogas que se combinan con un receptor y desencadenan una sucesión de efectos en un tejido se llaman "agonistas". Si se

supone que esta interacción es reversible y que el efecto resultante es proporcional al número de receptores ocupados, la ecuación de la reacción puede enunciarse:



Esta sucesión de reacciones, análoga a la interacción de una enzima y su sustrato, y la magnitud del efecto pueden analizarse de manera semejante a la aplicada en la formación de productos enzimáticos. La ecuación tiene forma idéntica a la de Michaelis-Menten

$$\text{Efecto} = \frac{(E_{\text{max}}) (D)}{K_D + (D)}$$

en que: E_{max} = efecto máximo

D = concentración de la droga o sustancia libre

K_D = constante de disociación del complejo DR

El gráfico de la respuesta del tejido en función de la ocupación de receptores para un agonista total demuestra una función hiperbólica que puede linearizarse mediante la transformación de Lineweaver-Burk para la cinética enzimática.

$$\frac{1}{\text{Efecto}} = \frac{K_D}{(E_{\text{max}}) (D)} + \frac{1}{E_{\text{max}}}$$

Del gráfico de $1/\text{Efecto}$ en función de $1/(D)$ se pueden obtener los valores de E_{max} y $-K_D$ como las inversas de las intersecciones con los ejes de ordenadas y abscisas, respectivamente.

8. RECEPTORES β ADRENERGICOS

La caracterización y estudio de los efectos de los anticuerpos sobre los receptores beta adrenérgicos se llevó a cabo esencialmente por la técnica de Limas y col. (247, 248) en el tejido blanco de la inmunización, es decir, en miocardio de ratón. La especificidad de órgano se probó con un diseño semejante al de miocardio pero en membranas de linfocitos y adipocitos; mientras que la especificidad de especie se puso de manifiesto sobre miocardio de ratas y cobayos.

8.1. Preparación de membranas

Los animales fueron sacrificados por decapitación y sus corazones removidos rápidamente y ubicados en capsulas de Petri con solución de KRB, gaseada con carbógeno, para eliminar la mayor parte de la sangre retenida en las cavidades. A continuación, se separó el miocardio auricular, se lavó con una solución tampón de Tris-HCl 5mM (pH 7,4), MgCl_2 1 mM y sacarosa 250 mM frío y luego se homogeneizó en la misma solución en una

relación 1:4 (p/v). Este paso y todos los siguientes se realizaron a 4°C. Para la homogeneización se empleó un Ultra Turrax durante 15 segundos a cada una de tres velocidades, baja, media y alta. El procedimiento se repitió dos veces más con intervalos de 30 segundos. Una vez homogeneizado, fue filtrado por una malla fina para retener los restos de tejido y fibras conectivas, para luego centrifugar el filtrado a 700 x g durante 15 minutos. El sedimento fue descartado y el sobrenadante se decantó a otro tubo y se centrifugó por 10 minutos a 10.000 x g para descartar la fracción mitocondrial. El sobrenadante resultante fue sometido a 40.000 x g durante 30 minutos, con el fin de obtener la fracción microsomal. El sedimento final se lavó dos veces con solución tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgCl₂ 10mM; y luego se resuspendieron las membranas en esta misma solución y se llevaron a una concentración aproximada de proteínas de 3 a 5 mg/ml, determinada por el método de Lowry y col. (243).

Las membranas de linfocitos y adipocitos se obtuvieron de manera similar: En el primer caso, las suspensiones de células totales de bazo de ratón lavadas fueron tratadas con solución tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 8) con MgCl₂ 10 mM, homogeneizadas con Ultra Turrax como las membranas cardíacas y centrifugadas a 25.000 x g por 15 minutos (249, 250). Por su parte, las membranas de adipocitos se obtuvieron a partir de la grasa epididimal mediante lisis hipotónica en Tris-HCl 5 mM (pH 7,5), MgCl₂ 2,5 mM

y EDTA 1 mM, homogeneización en Tris-HCl 50 mM (pH 8) y centrifugación a 49.000 x g por 10 minutos (251). Tanto las membranas de linfocitos como las de adipocitos se resuspendieron en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgCl₂ 10 mM a una concentración de proteínas de 0,5 a 2 mg/ml.

8.2. Identificación de receptores β adrenérgicos

Los ensayos de unión del antagonista (-)-[³H]-Dihidroalprenolol ([³H]-DHA) a las membranas cardíacas se llevaron a cabo según la técnica de Alexander y col. (88). Para linfocitos y adipocitos, los métodos descriptos (249-251) son semejantes al anterior.

Las pruebas de unión específica comenzaron con el agregado de 100 μ l de la suspensión de membranas cardíacas (aproximadamente 300 μ g de proteínas) en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgCl₂ 10 mM a los tubos que contenían una concentración fija o variable de [³H]-DHA (actividad específica 38,5 Ci/mmol, New England Nuclear). Las incubaciones se realizaron en un baño termostatzado a 37°C con agitación, en un volumen final de 150 μ l. Al cabo de 15 minutos se detuvo la reacción por dilución con 4 ml de tampón helado y filtración con vacío por membranas de fibra de vidrio Whatman GF/C. Los filtros se lavaron con 10 ml de tampón helado y colocaron en viales donde, una vez secos, se midió la radioactividad en un espectrómetro de centelleo líquido.

La mezcla centelladora estaba compuesta por 30 % de Tritón X-100 en una solución de 4 g de PPO (2,5-difenil oxazol) y 50 mg de POPOP (1,4-bis[2-(5-fenil oxazolil)]-benceno) en 1 litro de tolueno.

Para la transformación de cpm en fmoles se consideró la eficiencia (η) de 40-45 % obtenida experimentalmente y se sustituyeron los valores en la siguiente ecuación:

$$\text{fmol } [^3\text{H}]\text{-DHA} = \frac{[^3\text{H}]\text{-DHA unido (cpm)} \times 10^{12} \text{ fmol/nmol}}{\eta \text{ (cpm/dpm)} \times 2,22 \cdot 10^{12} \text{ dpm/Ci} \times \text{Act. esp. (Ci/nmol)}}$$

A su vez, estos fmoles de [³H]-DHA unidos se normalizaron por mg de proteína en cada ensayo.

Además, dado que la unión del ligando radioactivo ocurre también en sitios no específicos, se considera unión específica a la diferencia entre las cpm unidas totales y las que se unen en presencia de un exceso de ligando beta adrenérgico no radioactivo. Esta última o inespecífica se obtuvo por agregado de 10^{-5} M de (-)-propranolol y en ningún caso superó el 35 % de la unión total a las concentraciones de ligando radioactivo empleadas. Por último, en las condiciones de los ensayos, la cantidad de radioactividad unida total no superó el 10 % de la radioactividad total agregada.

8.3. Estudios de unión de [³H]-DHA. Ensayos de desplazamiento

En membranas cardíacas, de linfocitos y de adipocitos se realizaron ensayos de desplazamiento con agonistas o antagonistas beta adrenérgicos, así como con IgG autoinmune y controles. Para ello, la suspensión fue previamente incubada durante 30 minutos a 30°C en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de IgG en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgCl₂ 10 mM. Luego de la incubación se centrifugaron a 40.000 x g durante 30 minutos a 4°C y el sedimento, lavado, se resuspendió en el mismo tampón y en el volumen inicial.

Las suspensiones fueron incubadas con agitación a 37°C, 15 minutos, con 1,1 nM de [³H]-DHA con o sin (-)-propranolol 10⁻⁵ M y luego procesadas del mismo modo que se indicó en 8.2.

Los resultados se expresaron como % de [³H]-DHA unido con respecto a la unión específica del ligando radioactivo en ausencia de IgG, la cual se consideró como el 100 % de unión.

8.4. Ensayos de saturación

Los ensayos de saturación se realizaron sobre membranas cardíacas murinas y se procedió en forma similar a la descripta en 8.2. En este caso, se fijó la concentración de IgG en 10⁻⁷ M y se varió la cantidad de ligando radioactivo desde 0,6 a 6 nM. Las condiciones de incubación de las membranas con las IgG como las

de equilibrio de union fueron las mismas que en los ensayos de desplazamiento.

La interacción hormona-receptor, del mismo modo que la relación concentración-efecto y enzima-sustrato, puede describirse con la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{X}{X + K_D} \quad (I)$$

en que: Y representa la cantidad de ligando radioactivo unido a un sitio especifico/mg proteina. (B)
X representa la concentración de ligando radioactivo no unido o libre, en concentración nM. (F).

En los estudios de unión a receptores, la variable independiente es la cantidad de ligando agregado no unido (F) y de ella depende la cantidad de ligando unido (B).

El objeto de los ensayos de saturación fue determinar los parámetros que caracterizan la relación entre las variables, que son:

B_{max} maxima capacidad de unión o número máximo de sitios de unión especifica/mg de proteina.

K_D constante de disociación para el complejo ligando radioactivo-receptor.

Estos parametros pueden calcularse a partir de las curvas de saturación mediante el análisis de Scatchard (252). Este método permite transformar la hipérbola rectangular que responde a la ecuación I en una recta definida por la siguiente expresión

$$B/F = B_{max} / (1 + K_D / [D])$$

Así, se calcula B_{max} como la intersección con el eje de abscisas y K_D como la inversa negativa de la pendiente.

El análisis de regresión lineal para calcular estos parámetros se realizó según Zivin y Waud (253).

9. RECEPTORES COLINERGICOS MUSCARINICOS

Las técnicas empleadas para la identificación y caracterización de los receptores colinérgicos muscarínicos en el miocardio murino se basaron fundamentalmente en las descritas por Mattera y col. (132) y Waelbroeck y col. (254). Los ensayos de especificidad de órgano se realizaron en vejiga murina y se usó el miocardio de ratas y de cobayos para estudiar la especificidad de especie.

9.1. Preparación de las suspensiones de membrana

Los animales fueron muertos por decapitación y sus corazones

disecados y ubicados en cápsulas de Petri con medio de KRB. Una vez que eliminaron la sangre presente en las cavidades, se separó el miocardio auricular, se lavó con solución reguladora de Tris-HCl 5mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 1 mM, sacarosa 250 mM. Este y los pasos siguientes se realizaron a 4°C. Las aurículas se suspendieron en la misma solución en una relación 1:6 (p/v) y se homogeneizaron con un Ultra Turrax a tres velocidades crecientes, baja, media y alta, 15 segundos a cada una. El homogenato fue centrifugado a 900 x g dos veces. Los sedimentos fueron descartados y los sobrenadantes centrifugados a 10.000 x g durante 15 minutos y luego a 40.000 x g por 1 hora. El sedimento resultante se lavó y resuspendió en la solución A (Tris-HCl 50 mM , pH 7,5, $MgCl_2$ 5mM) y se ajustó la concentración de proteínas entre 0,5 y 1,5 mg/ml.

Las membranas de vejiga de ratón se obtuvieron y procesaron de forma similar y su concentración proteica fue alrededor de 2 mg/ml.

9.2. Identificación de receptores

La identificación de receptores colinérgicos muscarínicos se realizó por unión de un ligando específico marcado radioactivamente, el L-[bencilico-4,4'-³H (N)]-quinuclidinil bencilato ([³H]-QNB), de acuerdo a las técnicas descriptas (132, 160, 161, 254).

Las suspensiones de membranas cardíacas (aproximadamente 100

µg) se incubaron con [³H]-QNB (actividad específica: 43,3 Ci/mmol) en solución A durante 1 hora a 25 °C con agitación constante. La reacción, en un volumen final de 150 µl, se detuvo por dilución con 4 ml de solución A helada y luego filtración a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C bajo presión. Los filtros se lavaron dos veces con solución A fría, se ubicaron en viales, se secaron y finalmente se contó la actividad en los mismos con solución centelladora en un espectrómetro de centelleo líquido.

La unión inespecífica se definió como aquella no bloqueable por atropina 1 µM y no superó el 10 % a las concentraciones de ligando radioactivo usadas. Por último, se trabajó en condiciones de unión de un 10 % de la radioactividad total agregada.

9.3. Ensayos de desplazamiento

Se realizaron ensayos de competición entre el ligando radioactivo y agonistas, antagonistas o IgG sobre membranas cardíacas y de vejiga de ratón, del mismo modo que sobre membranas cardíacas de rata y cobayo. Las condiciones de incubación fueron semejantes a las descritas en el punto 9.2., en este caso, la concentración de ligando radioactivo se fijó en 0,3 nM y se varió la cantidad de IgG (controles y autoinmune) o de ligandos no marcados radioactivamente. En los experimentos con IgG, las mismas se incubaron con las membranas a distintos

tiempos y en diferentes concentraciones, luego se centrifugaron a $40.000 \times g$ 1 hora para eliminar el exceso de IgG y finalmente se sometieron a los experimentos de unión con el [3H]-QNB. En el resto de los estudios, las membranas se incubaron en idénticas condiciones antes de la competición con agonistas o antagonistas.

Los resultados se expresaron en porcentaje de [3H]-QNB unido con respecto a la unión específica de este ligando en ausencia de IgG considerada como el 100 %.

9.4. Ensayos de saturación

Se procedió del mismo modo que en el punto 9.3. salvo que aquí se varió la cantidad de [3H]-QNB (0,1 a 5 nM) y se mantuvo fija la concentración de IgG (5.10^{-7} M).

Los valores de las curvas de saturación se transformaron mediante el análisis de Scatchard de forma tal que se obtuvieron líneas rectas de las que, por regresión lineal, se calcularon los parámetros que caracterizan a la unión, como son el K_D y el B_{max} . El análisis es idéntico al descrito en la sección 8.4.

10. DOSAJE DE LEUCOTRIENO C4

La liberación de LTC4 se midió por radioinmunoensayo con un equipo comercial provisto por New England Nuclear que emplea un

antisuero anti LTC₄ obtenido en conejo y carbón activado para separar el LTC₄ libre del unido. Los sobrenadantes se volcaron en viales, se agregó solución centelladora y se midió la actividad en un contador de centelleo líquido.

El ensayo se realizó sobre corazones normales controles o inmunizados contra corazón: En todos los casos se pesaron y se incubaron en KRB, pH 7,4, a 30°C durante 30 minutos con burbujeo de CO₂ al 5 % en O₂. En los experimentos realizados con células inmunes y corazón normal, se midió el LTC₄ liberado al cabo de 20 minutos de agregadas $4 \cdot 10^7$ células de animales inmunizados o controles. Los inhibidores de ciclooxigenasa y lipoxigenasa se incluyeron en el medio de incubación y se dejaron actuar 20 minutos antes de computar los tiempos establecidos para los ensayos. Una vez cumplida la incubación, se removieron los corazones y luego las células por centrifugación 10 minutos a 400 x g y 4°C. La determinación de LTC₄ se realizó sobre 100 µl de este sobrenadante y los resultados se expresaron en ng LTC₄/g de tejido húmedo.

11. DOSAJE DE NUCLEOTIDOS CICLICOS

Los niveles intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) y guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc)

fueron determinados por radioinmunoensayo con equipos comerciales de Amersham, el primero y New England Nuclear, el GMPc. Estos emplean como trazadores a los nucleótidos marcados [8-³H]-AMPc y el metil ester derivado de succinil [¹²⁵I]-tirosina-GMPc, que compiten con el nucleótido frío por una proteína kinasa, en el caso de AMPc, y por un antisuero específico, en el otro caso. La separación del nucleótido libre del unido se realiza con carbón: albúmina sérica bovina (5:1) para AMPc y con un segundo antisuero para GMPc y centrifugación a 800 x g 15 minutos. La radioactividad en el sobrenadante del primero se midió con un espectrómetro de centelleo líquido en presencia de solución centelladora y en el segundo se determinó la actividad en el sedimento mediante un espectrómetro de centelleo sólido.

Los niveles de mensajeros fueron medidos en condiciones basales, esto es, luego de 20 minutos de incubación de las aurículas murinas a 37°C en KRB, pH 7,4, con burbujeo de 5 % de CO₂ en O₂ o en presencia de IgG proveniente de ratones de los cuatro grupos en estudio, en tiempos y concentraciones variables. Además se emplearon diversas drogas con el fin de comparar y caracterizar los efectos de las IgG, las que se dejaron actuar convenientemente.

12. DROGAS USADAS

Los agentes farmacológicos empleados en los ensayos fueron los siguientes:

(-)-propranolol (Ayerst Laboratory)

Indometacina (Merck, Sharp y Dhome)

7-(3-(4-acetil, 3-hidroxi-2-propilfenoxi)-2-hidroxi-propoxi)-4-oxo-8-propil-4H-1-benzopirán-2-carboxilato de sodio (FPL 55712) (Fisons Ltd.)

fentolamina (Ciba-Geigy Lab.)

Los siguientes reactivos fueron adquiridos en Sigma Chemical Co: (-)-norepinefrina, (-)-isoproterenol, ácido acetilsalicílico, ácido nordihidroguayarático, difenilditlocarbazona (ditizona), difenhidramina, carbamilcolina, acetilcolina y atropina.

El resto de los reactivos empleados fueron de calidad analítica.

13. ANALISIS ESTADISTICO

En todos los casos, los resultados se compararon por medio de la prueba "t" de Student, salvo otra indicación, y las diferencias se consideraron significativas si $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACION DEL MODELO DE MIOCARDITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL: EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL

Con el objeto de evaluar la respuesta inmune celular y humoral, los ratones inmunizados con corazón y los controles fueron estudiados individualmente.

1.1. Estudios histológicos

A la observación histológica, 36 de 41 ratones del grupo I (inyectados con corazón) presentaron miocarditis (88 %), mientras que 2 de 24 (8 %) de los inmunizados con testículo y 3 de 24 (12 %) del grupo inmunizados con adyuvante de Freund solo exhibieron signos de inflamación en el miocardio. Por estudios previos se conocía la baja frecuencia de desarrollo de miocarditis espontánea en esta cepa de ratones: En coincidencia con esas observaciones, el grupo control no inmunizado no presentó lesiones ni infiltración linfomononuclear (0/24).

Las lesiones consistieron en nidos redondos o alargados de infiltrados linfomononucleares, distribuidos en forma difusa en la aurícula de 12 animales y en el ventrículo de 18, mientras que la infiltración fue focal en los casos restantes (Figuras 5 y 6).

En algunos animales las lesiones miocárdicas fueron más severas y difusas en la aurícula que en el ventrículo pero en

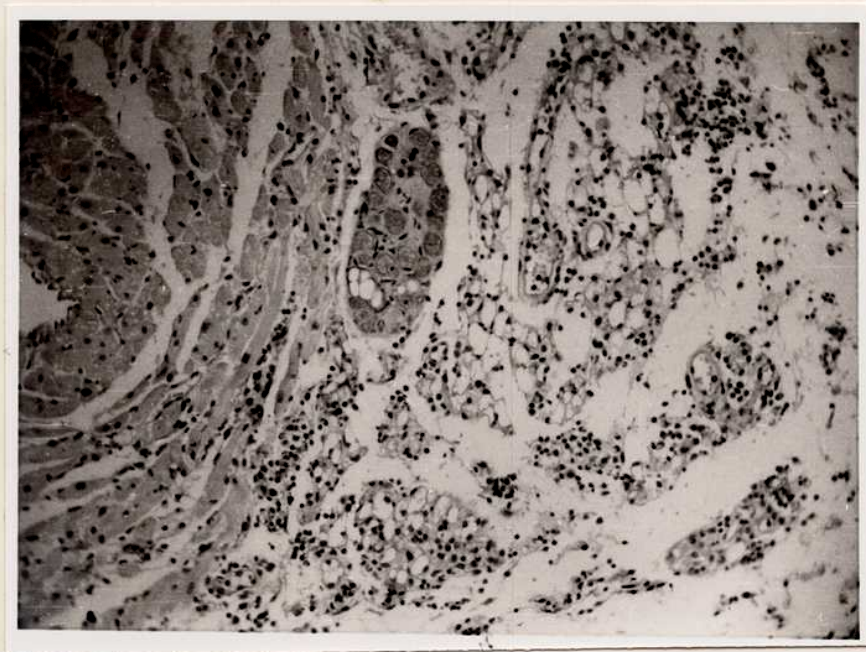


Figura 5: Infiltrado mononuclear difuso en el endomisio de las fibras miocárdicas auriculares, de grado intermedio, constituido en su mayoría por linfocitos de diferentes grados de maduración.



Figura 6: Nidos y cordones de linfocitos maduros en el endomisio de las fibras miocárdicas ventriculares. Las células mononucleares son en su mayoría linfocitos maduros y conforman un infiltrado de intensidad moderada.

ningún caso se observaron lesiones fibróticas ni necrosis de las fibras miocárdicas. De los 36 animales que dieron pruebas positivas de miocarditis, 4 fueron 3+, 10 fueron 2+ y 22 fueron 1+. Por su parte, los controles inyectados con testículo o adyuvante que mostraron signos de inflamación fueron clasificados como 1+ los primeros, y 1+ y ± los del grupo adyuvante.

Los valores promedio de células linfomononucleares (CLM)/64 cm² en los 24 ratones inmunizados con testículo fueron 7,6 ± 10,3 para las aurículas y 6,5 ± 9,7 para los ventrículos. Asimismo, los ratones tratados con adyuvante solo presentaron valores de 5,7 ± 8,9 en ambos. En los casos positivos de miocarditis de estos controles, indicados como 1+ y ±, el promedio de CLM/64 cm² fue de 29,5 ± 7,7 en aurícula y 33 en ventrículo para los primeros y de 27,1 ± 16 en aurícula para los segundos. Los ratones inmunizados con miocardio mostraron un promedio de 192 ± 56 CLM/64 cm² en aurícula y 111 ± 42 en ventrículo.

Los músculos de la pata delantera analizados histológicamente, no mostraron signos de miositis.

1.2. Ensayos de inmunofluorescencia

La respuesta humoral fue evaluada por inmunofluorescencia indirecta sobre cortes de miocardio. De los 36 animales del grupo I que mostraban signos de miocarditis, 33 dieron pruebas de

inmunofluorescencia positivas y los 4 inmunizados que no presentaron respuesta celular específica, tampoco observaron anticuerpos circulantes contra el miocardio. La dilución ensayada en todos los casos fue 1:30. Los sueros de ratones del grupo II (inmunizados con testículo) fueron positivos en 3 de 24 casos y ninguno de ellos coincidió con infiltración del miocardio. Con respecto a los animales tratados con adyuvante, en 2 de 24 se observó fluorescencia, en este caso tampoco fueron los mismos que habían desarrollado inflamación. Los animales no inmunizados demostraron ausencia de anticuerpos reactivos.

Las pruebas de inmunofluorescencia indirecta sobre cortes de músculo estriado proveniente de la pata delantera de ratones normales resultaron positivas, con preferencia por las fibras rojas.

La inmunofluorescencia indirecta se repitió en monocapa de miocardiocitos con 8 de los sueros positivos de animales inoculados con miocardio y 5 negativos (de los inmunizados con testículo). Mientras que los 5 controles resultaron negativos sobre este sustrato, los 8 sueros positivos en cortes también mostraron fluorescencia en las células en cultivo. Mas aun, en la reacción de inmunofluorescencia las células cardíacas en cultivo presentaron una tinción superficial, la cual no se modificó por absorción de los sueros con miosina y, en cambio, desapareció al absorber con un homogenato de corazón singeneico (Figuras 7 y 8).



Figura 7: Prueba de inmunofluorescencia indirecta sobre células miocárdicas de rata en cultivo primario. El suero de un ratón del grupo I fue ensayado en una dilución 1:10 y revelado con un suero anti-IgG de ratón obtenido en conejo, marcado con fluoresceína. Aumento 400x.



Figura 8: Prueba de inmunofluorescencia indirecta sobre un cultivo primario de miocardiocitos de rata. Una dilución 1:10 del suero de otro ratón del grupo I se ensayó según se describió en Materiales y métodos. Aumento 400x.

2. EVALUACION DE LA FUNCION DEL MIOCARDIO AUTOINMUNE

2.1. Parámetros contráctiles

La inmunización de ratones con tejido cardíaco generó una variedad de trastornos del ritmo y la conducción auricular: Además de las arritmias, las aurículas presentaron taquicardia, desorden que se manifestó a 37°C con mayor intensidad (Figura 8). Al mismo tiempo desarrollaron una tensión contráctil menor que los controles: Este fenómeno no se revirtió con el tiempo y, en cambio, la tensión tendió a disminuir pasados los 30 minutos (Figura 10).

2.2. Participación de los productos del ácido araquidónico

La incubación previa del tejido miocárdico autoinmune con inhibidores de las enzimas ciclooxigenasa y lipoxigenasa aportó evidencias de la participación de productos del metabolismo del ácido araquidónico (AA) en estas alteraciones. En particular, el ácido nordihidroguayarético (ANDG) en concentración 10^{-5} M y la ditizona (10^{-5} M) fueron capaces de mejorar los parámetros contráctiles hasta valores semejantes a los controles (Figura 11 A y B), mientras que no tuvieron efecto sobre las aurículas de animales normales ni de aquellos inoculados con testículo (Tabla 1). Ni la indometacina (INDO) 10^{-6} M ni el ácido

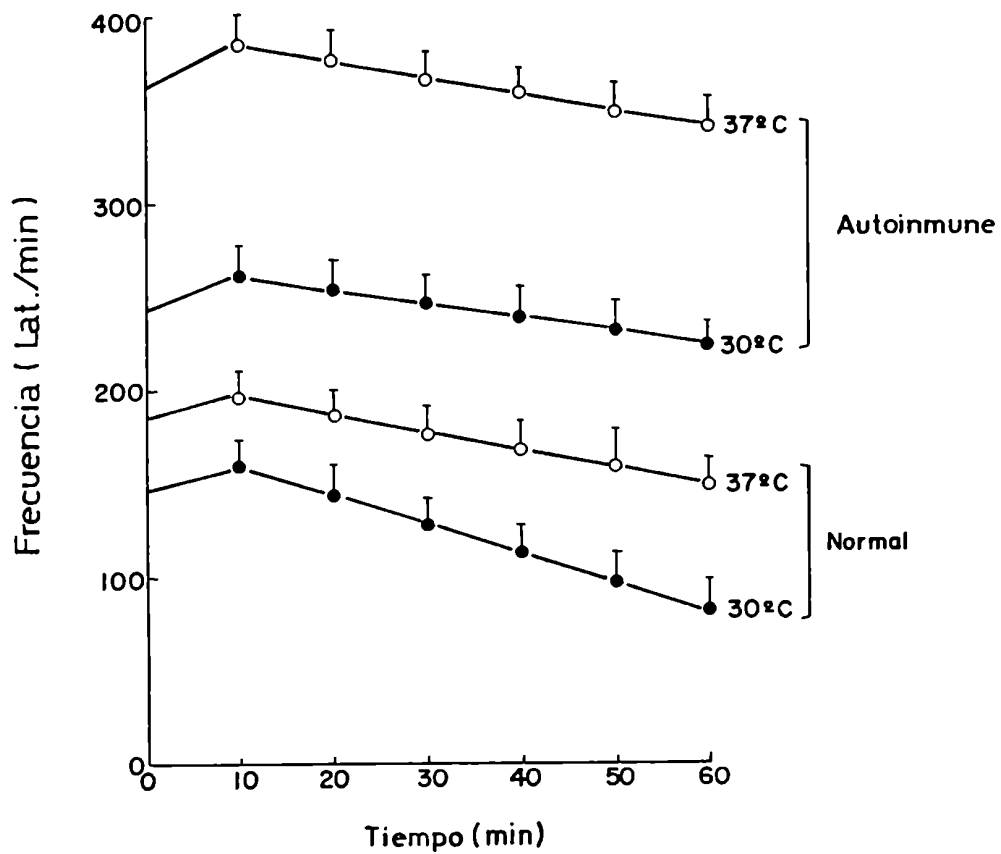


Figura 9: Frecuencia de contracción desarrollada por las aurículas de ratones del grupo I (autoinmune) o del grupo II (normal) y efecto de la temperatura de incubación. Los puntos representan los valores promedio y las barras, \pm E.S. Se realizaron 6 experimentos en cada grupo.

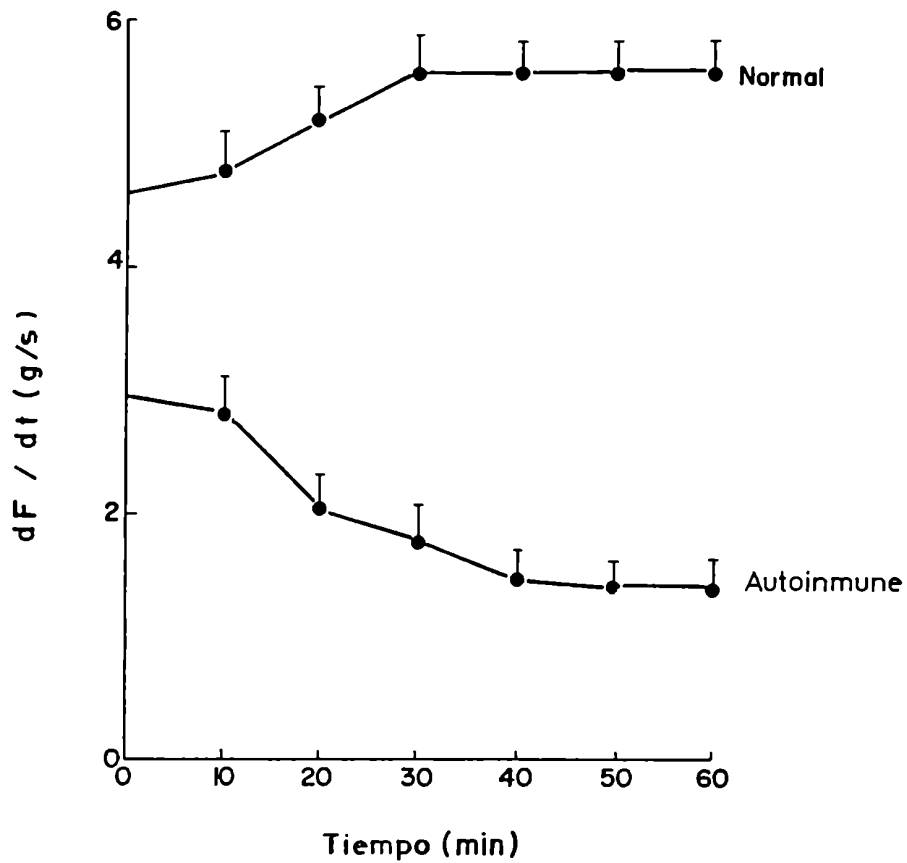


Figura 10: Contractilidad desarrollada por las aurículas controles del grupo II (normal) y de animales inmunizados con corazón (autoimmune) en las condiciones de incubación descritas en Materiales y Métodos. Los puntos y las barras representan los valores promedio de 6 experimentos \pm E.S.

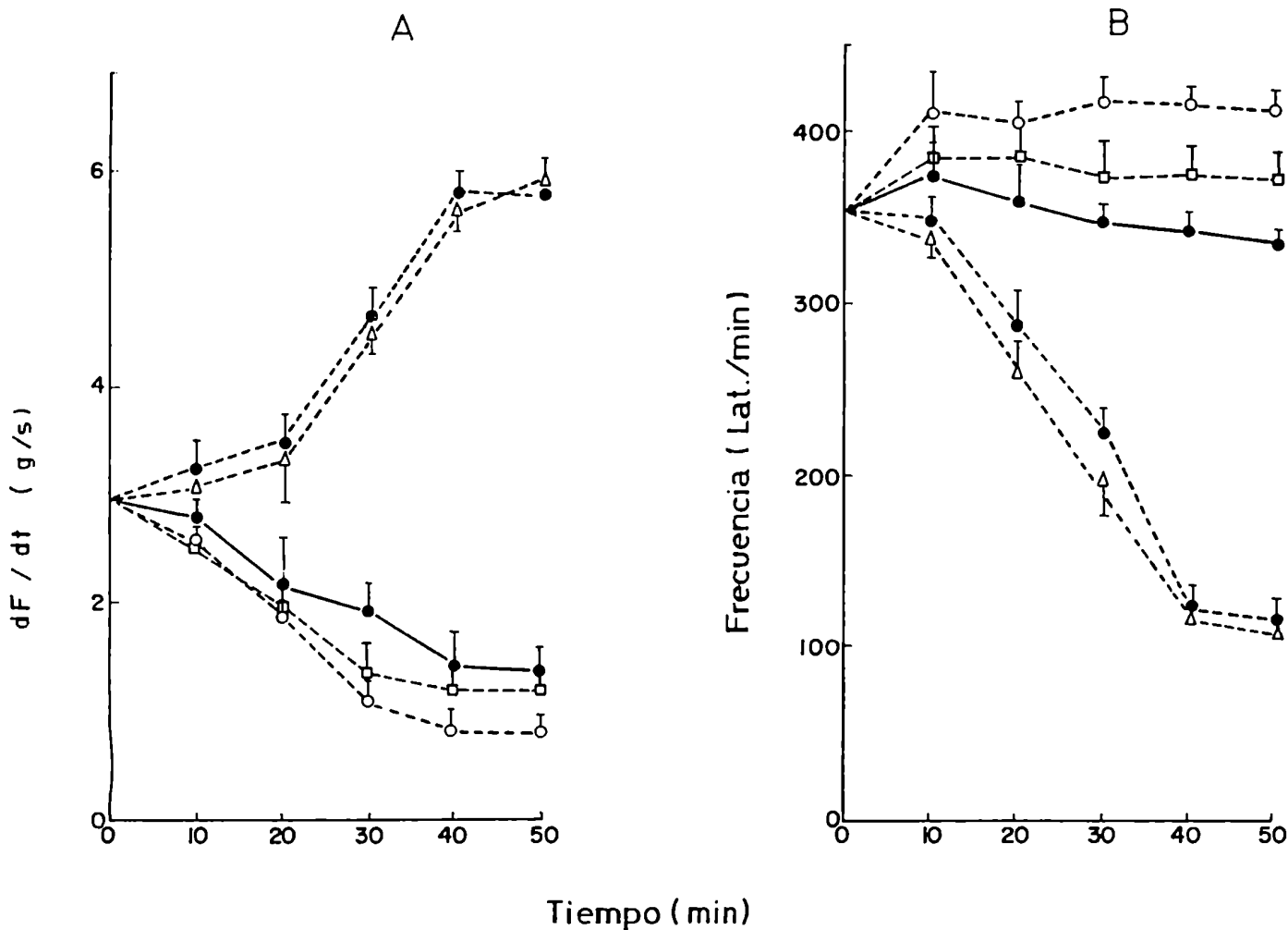


Figura 11: Efecto de diversos inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico sobre la contractilidad de las aurículas de animales inmunizados con corazón. Medio K.R.B. sin inhibidores (●—●), indometacina 10^{-6} M (○- - -○), ácido acetilsalicílico $1,8 \times 10^{-4}$ M (□- - -□), ANDG 10^{-5} M (●- - -●) y ditizona 10^{-5} M (△- - -△). Los inhibidores se agregaron 30 minutos antes del tiempo 0 y se registró el dF/dt (A) o la frecuencia contractil (B) a distintos tiempos. Los valores son medias \pm E.S. de 6 aurículas en cada caso.

Tabla 1: Influencia de diferentes drogas sobre la contractilidad de aurículas aisladas de ratones normales o inmunizados con testículo.

DROGAS	dF/dt (g/s)	
	Normales	Inmunizados c/ testículo
	4,3 ± 0,4	4,0 ± 0,3
Indometacina (10^{-6} M)	4,7 ± 0,5	4,2 ± 0,2
Difenhidramina (10^{-5} M)	4,3 ± 0,3	4,3 ± 0,3
Acido acetilsalicílico ($1,8 \cdot 10^{-4}$ M)	4,1 ± 0,3	4,0 ± 0,2
ANDG (10^{-5} M)	4,2 ± 0,3	4,1 ± 0,4
Ditizona (10^{-5} M)	4,0 ± 0,2	4,2 ± 0,3
FPL 55712 (10^{-7} M)	4,3 ± 0,3	4,2 ± 0,2

Los valores tabulados representan las medias ± E.S. de los dF/dt medidos luego de 40 minutos de incubación en K.R.B. como se describió en Materiales y Métodos, en presencia de las drogas indicadas.

acetilsalicílico (AAS) ($1.8 \cdot 10^{-4}$ M) modificaron los patrones de tensión y frecuencia de los corazones con miocarditis y, en algunos casos, se observó una tendencia a empeorar la situación por parte de la indometacina (Figura 11 A y B). En coincidencia con la acción de los inhibidores, los desórdenes contractiles disminuyeron sensiblemente -a veces desaparecieron por completo- cuando el miocardio autoinmune era tratado con un bloqueante de la actividad del LTC₄ y del receptor para la sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRL-A), el derivado benzopiránico FPL 55712 en concentración $5 \cdot 10^{-7}$ M (Figura 12 A y B). La figura 13 muestra trazados originales de varios tipos de arritmias y disfunción de la actividad cardiaca del miocardio autoinmune; y cómo la exposición durante 40 min al FPL 55712 revirtió estas alteraciones de la actividad mecánica del tejido.

Las evidencias precedentes sobre la participación de la SRL-A en las alteraciones fueron avaladas por una aumentada producción de LTC₄ de los corazones "autoinmunes", inhibida en gran parte por el ANDG y la ditizona, aunque no por INDO a las concentraciones consignadas más arriba (Figura 14).

3. ROL DE LAS CELULAS INMUNOLOGICAMENTE COMPETENTES EN LA DISENUNCIÓN DEL MIOCARDIO

Con el fin de determinar la posible influencia de las células mononucleares infiltradas en el miocardio en el

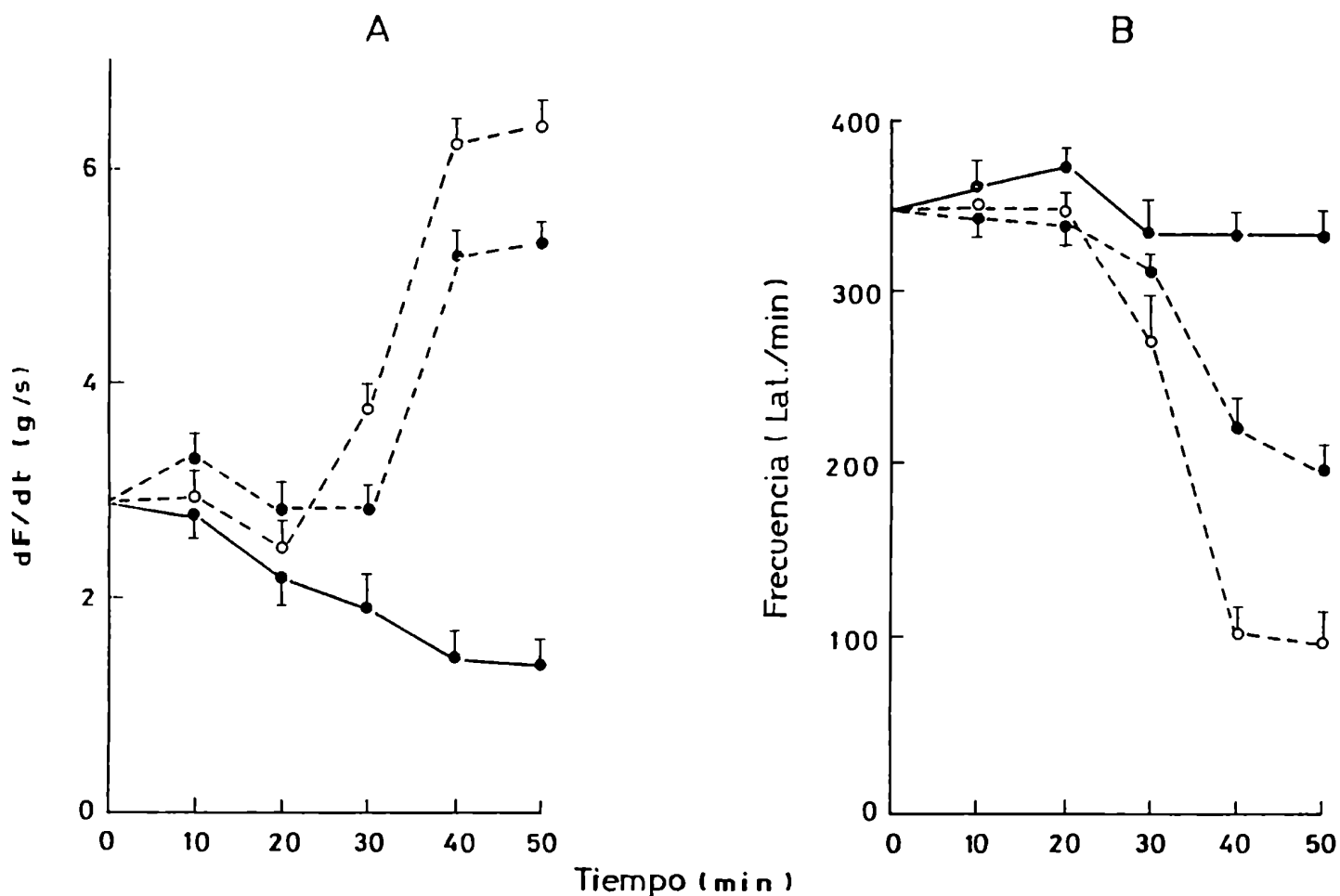


Figura 12: Efecto del FPL 55712 y la difenhidramina sobre el dF/dt (A) y la frecuencia contráctil (B) de las aurículas aisladas de ratones del grupo I (inmunizados con corazón). Los bloqueantes fueron incluidos en el K.R.B. en concentración $5 \cdot 10^{-7}$ M, el FPL 55712 (○---○), y 10^{-7} M la difenhidramina (●---●) y las aurículas se incubaron 30 minutos antes del comienzo de los registros (tiempo 0). Control: aurículas de ratones del grupo I en K.R.B. sin agregados (●—●). Los valores graficados representan las medias \pm E.S. de seis experimentos en cada grupo.

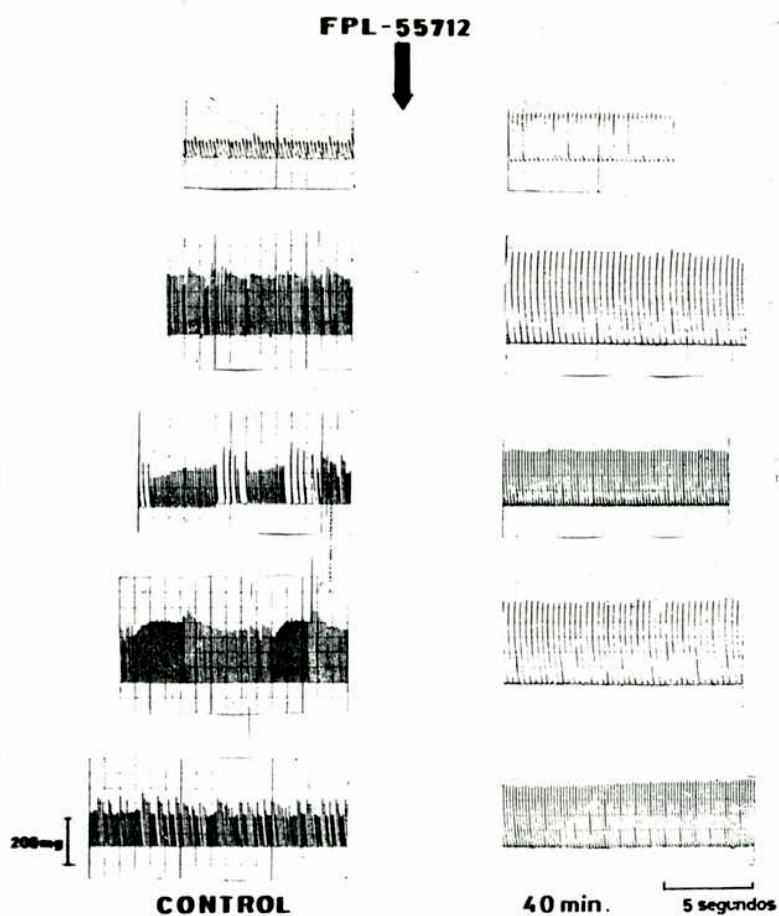


Figura 13: Registros originales de aurículas de ratones inmunizados con corazón latiendo espontáneamente en K.R.B. antes y después del agregado de FPL 55712. El bloqueante, agregado en concentración $5 \cdot 10^{-7}$ M, se dejó actuar 40 minutos al cabo de los cuales se realizó la segunda serie de registros.

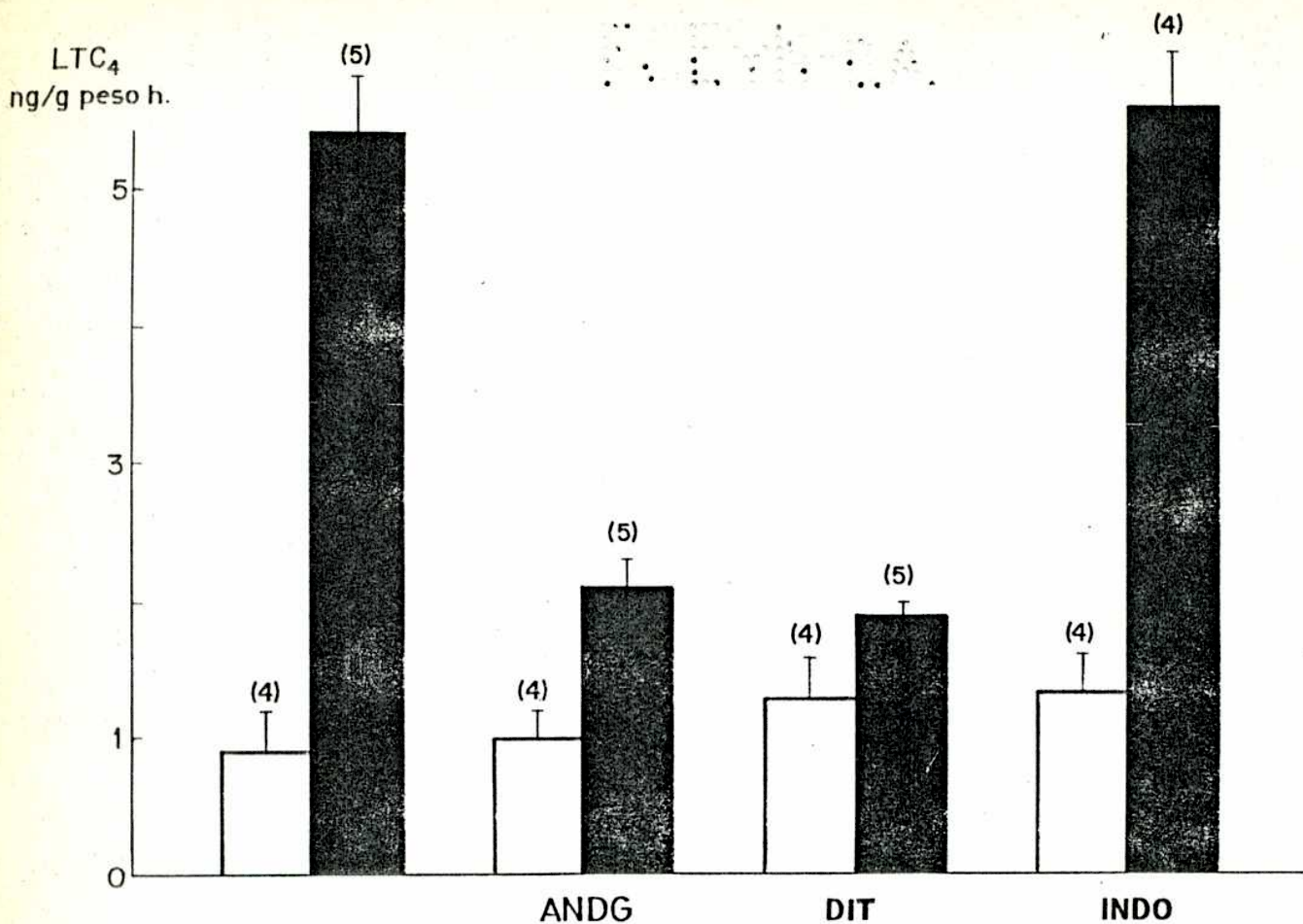


Figura 14: Producción de LTC₄ por aurículas controles del grupo II (□) o provenientes de ratones inmunizados con corazón (■). Los valores están expresados en ng de LTC₄ por g de peso húmedo del tejido y representan las medias ± E.S. de los experimentos señalados entre paréntesis. Los inhibidores ensayados se incluyeron en el medio 20 minutos antes de comenzar el ensayo y éste se realizó en las condiciones detalladas en Materiales y Métodos. ANDG, ácido nordihidroguayarético (10⁻⁵ M), DIT, ditizona (10⁻⁵ M), INDO, indometacina (10⁻⁶ M).

desarrollo de los desórdenes descritos precedentemente, se diseñó un sistema de interacción "in vitro" de células inmunes autorreactivas y corazón normal que se aproximara a la situación "in vivo". En este sistema, se evaluaron los mismos parámetros funcionales que en los miocardios infiltrados y se compararon los resultados.

3.1. Efecto de las células linfomononucleares de animales inmunizados sobre aurículas normales

Las células totales extraídas del bazo de ratones inmunizados -miocarditis y controles- fueron agregadas en cantidades crecientes a aurículas murinas que latían en condiciones fisiológicas (Figura 15). Se puede observar que las células de bazo provenientes de ratones con miocarditis autoinmune, inhibieron en forma dependiente de la concentración la contractilidad del miocardio normal. En tanto, aquellas extraídas de animales inyectados con testículo o adyuvante, como también las células normales estimuladas con Concanavalina A, fueron inefectivas en el sistema y, en el caso de las últimas, tuvieron una ligera acción estimulante (Figura 15). Los registros para cada concentración se realizaron a los 15 minutos de agregadas las células. La presencia de células de animales inmunizados con miocardio, en número superior a $8 \cdot 10^6$ por ml, indujo una variedad de arritmias que también pudieron observarse

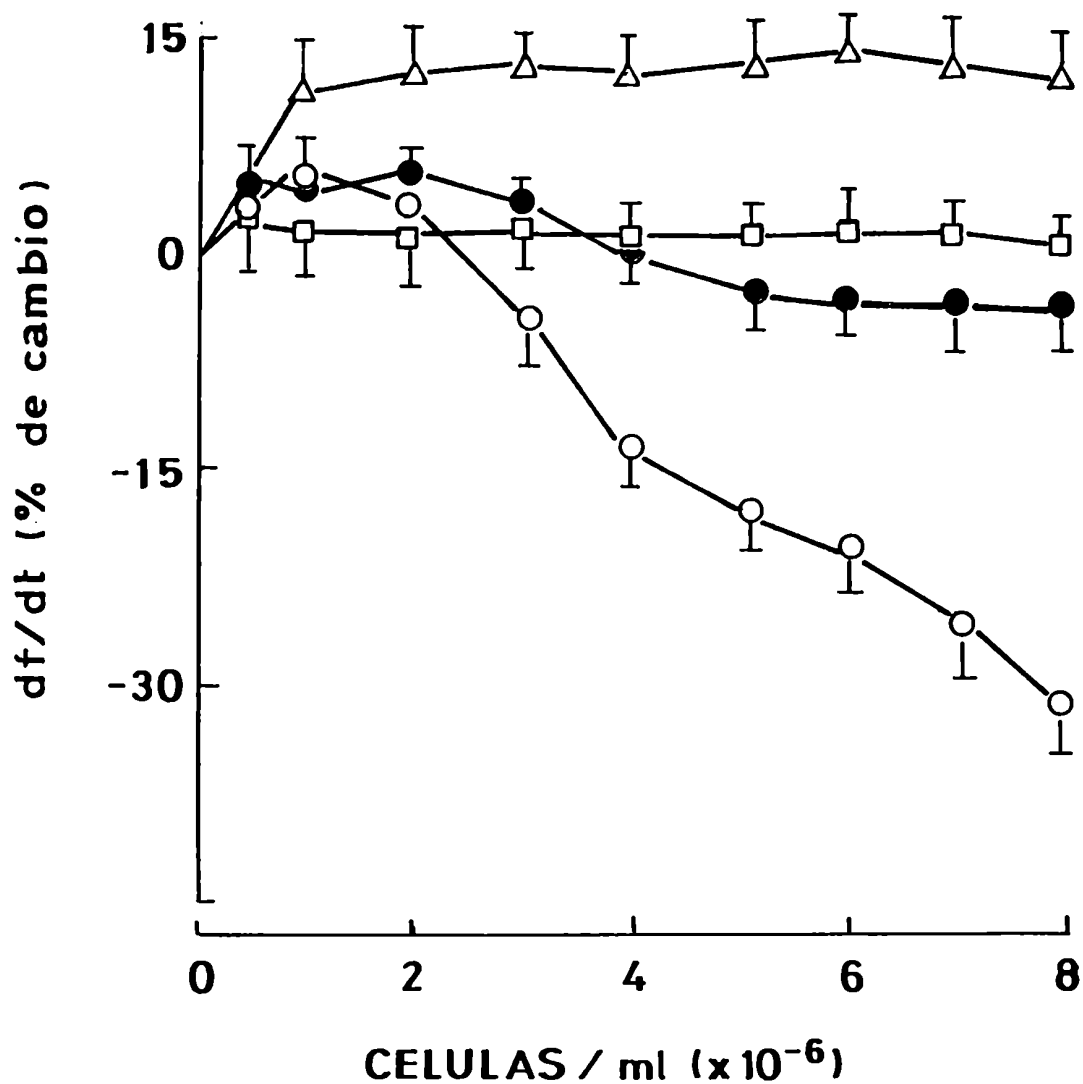


Figura 15: Efecto de concentraciones crecientes de células totales de bazo de ratones inmunizados con corazón y controles sobre la contractilidad de aurículas de ratones normales. Las células de ratones del grupo I (\circ — \circ), del grupo II (\bullet — \bullet), del grupo III (\square — \square) y las células de bazo de ratones normales tratadas con Concanavalina A ($10 \mu\text{g/ml}$) (\triangle — \triangle) fueron agregadas en cantidades crecientes y se efectuaron los registros a los 15 minutos de cada adición. Los valores graficados representan los promedios \pm E.S. de cinco experimentos de cada serie.

concentraciones menores (4.10^6 / ml) y 40 minutos de incubación, y eran comparables a las registradas con corazones autoinmunes con infiltrado linfomononuclear (Figura 16). Cabe destacar que los efectos no se verificaron al agregar 100 μ l de los sobrenadantes de las células inmunes incubadas previamente con burbujeo de CO₂ al 5 % en O₂ en medio de cultivo a 30 o 37°C durante 1 hora: El efecto dependió del contacto permanente con el tejido cardíaco (Figura 17).

3.2. Participación de los linfocitos T en el efecto depresor

Se procedió a ensayar las poblaciones de linfocitos T y B y los macrófagos: Cantidades crecientes de células permanecieron en contacto con aurículas normales durante 15 minutos (Figura 18): La población responsable del efecto depresor demostró ser aquella enriquecida en linfocitos T, mientras que los linfocitos B y los macrófagos se comportaron como las células de animales controles. Vale la pena comentar que las células B (4.10^6 /ml) agregadas simultáneamente con macrófagos de animales inmunizados (4.10^6 /ml) tampoco tuvieron efecto, pero, en cambio, el mismo número de células T con macrófagos produjeron un efecto depresor de -31 ± 6 % (n=3) en el dF/dt, algo más pronunciado que las células T sin agregado de macrófagos (observación personal).

Se realizó, entonces, una caracterización de las células responsables dentro de los linfocitos T, mediante el uso de

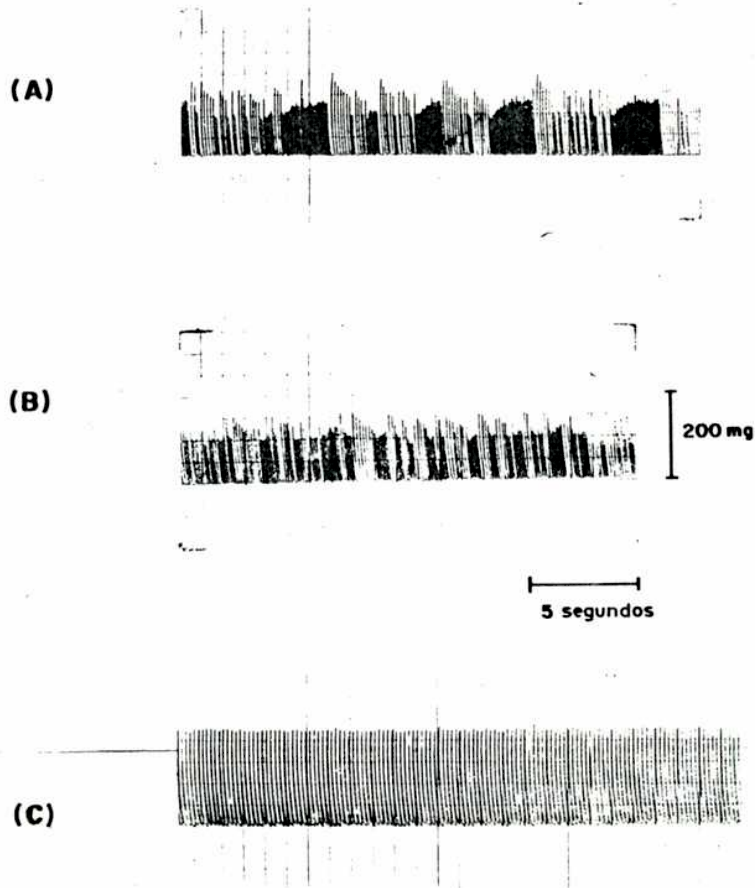


Figura 16: Trazados originales de la actividad contráctil espontánea de aurículas de ratones inmunizados con corazón (grupo I) en medio de K.R.B. (A) y de aurículas normales en presencia de (B): células inmunes de bazo de ratones del grupo I o (C): células normales tratadas con $10 \mu\text{g/ml}$ de Con A. Los registros corresponden a los 40 minutos luego del agregado de $4 \cdot 10^6$ células/ml.

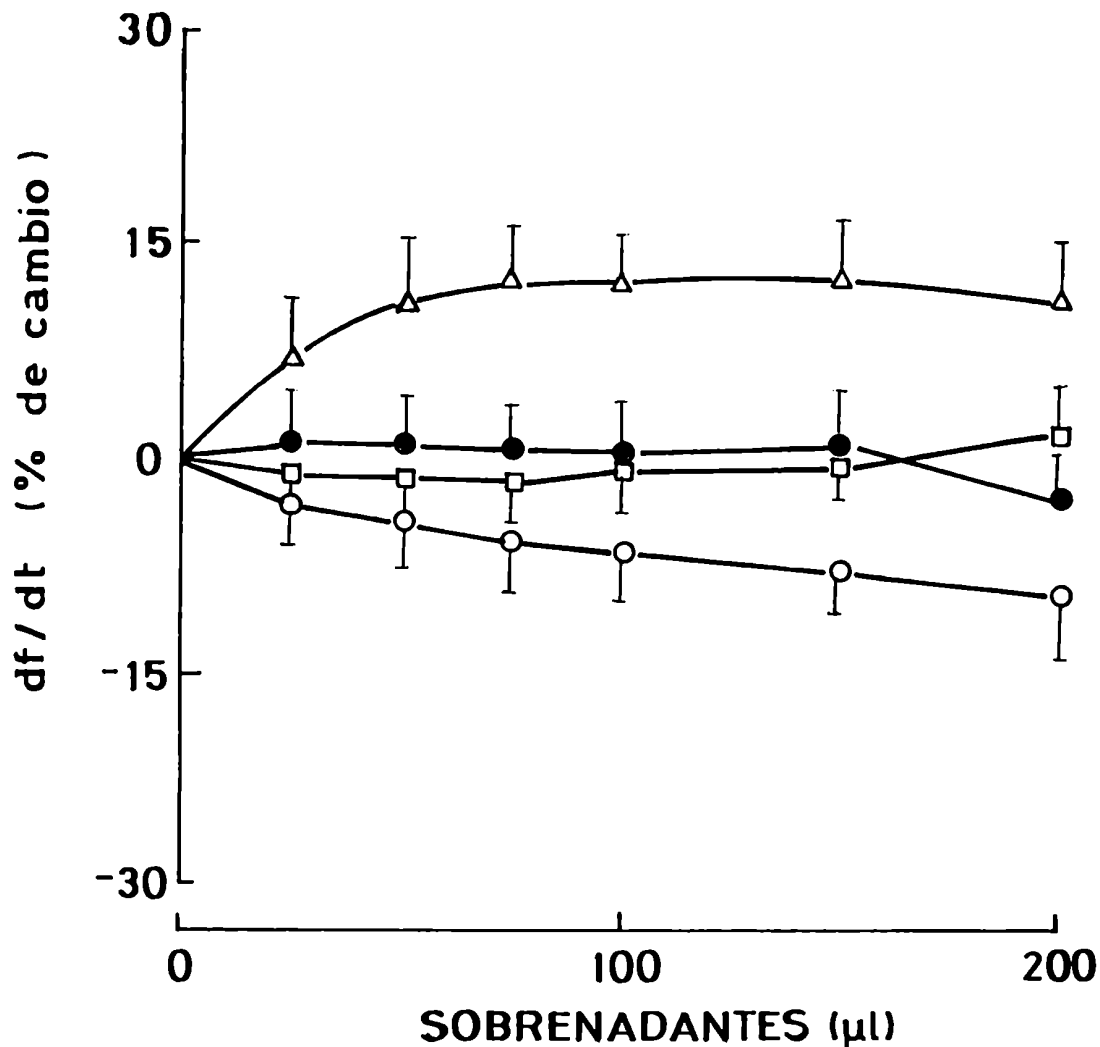


Figura 17: Efecto del agregado de sobrenadantes de células inmunes sobre aurículas normales. Los sobrenadantes de células de bazo de ratones del grupo I (inmunizados con corazón) (\circ — \circ), del grupo II (inmunizados con testículo) (\bullet — \bullet), del grupo III (adyuvante) (\square — \square) o de células de bazo de ratones normales tratadas con Con A ($10 \mu\text{g/ml}$) (Δ — Δ) fueron agregados en volúmenes crecientes y se registró el dF/dt a los 15 minutos. Los sobrenadantes se prepararon según se describió en Materiales y Métodos. Los valores representados son la media \pm E.S. de cuatro determinaciones separadas para cada grupo.

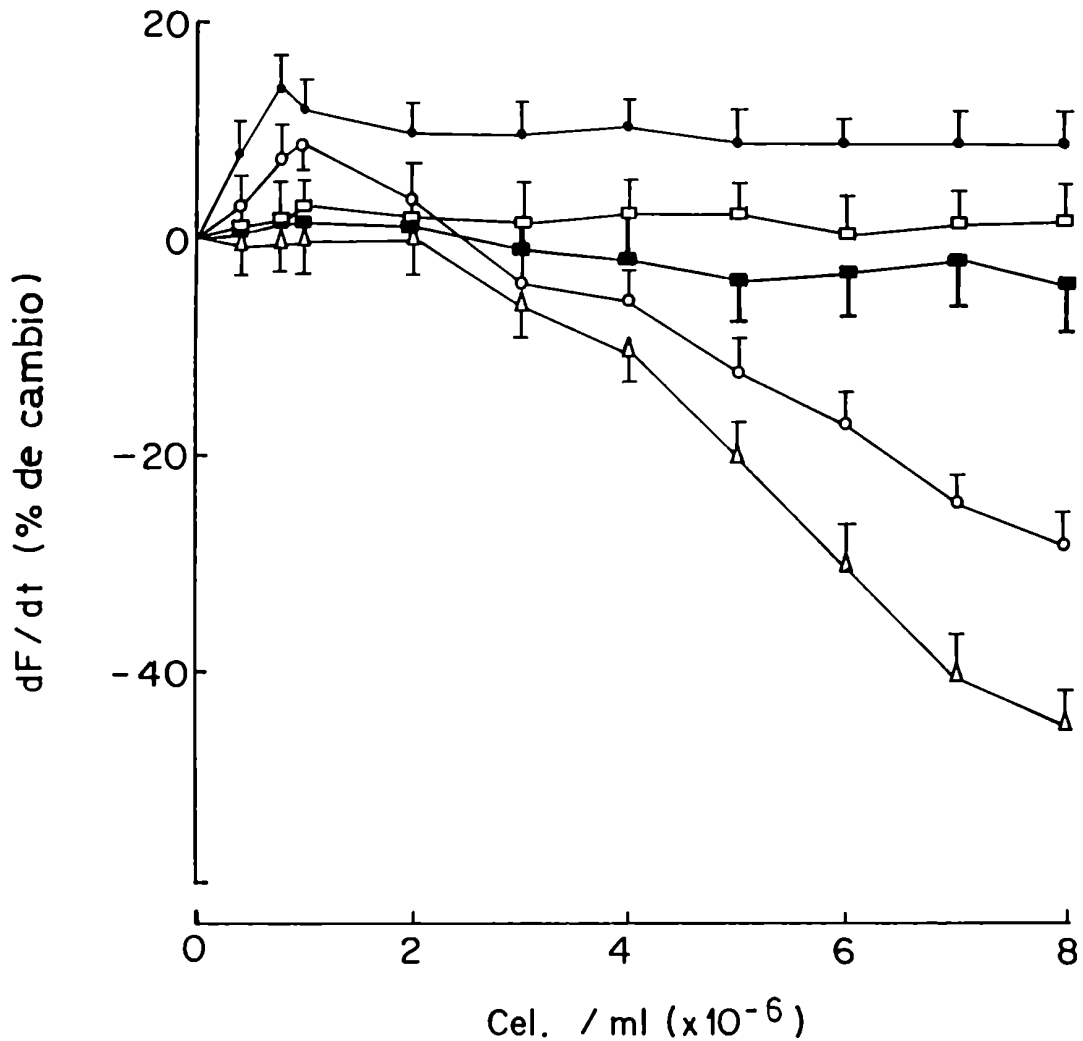


Figura 18: Actividad contráctil de aurículas normales en presencia de concentraciones crecientes de células inmunes. Las células provenientes de ratones del grupo I (inmunizados con corazón) fueron puestas en cantidades crecientes en contacto con las aurículas normales y los registros se realizaron a los 15 minutos de cada agregado. Células totales de bazo de ratones controles (grupo II) (□—□), células totales de bazo de ratones del grupo I (○—○), linfocitos B de ratones del grupo I (●—●), linfocitos T de ratones del grupo I (△—△) y macrófagos de ratones del mismo grupo (■—■). Cada valor graficado representa la media \pm E.S. de cinco experimentos.

anticuerpos monoclonales anti L3T4 y anti Lyt 2.2. y complemento. Las subpoblaciones enriquecidas en linfocitos T L3T4⁺ mostraron un efecto inhibitorio, mientras que las células Lyt 2⁺ tuvieron un efecto estimulante de la contractilidad (Figura 19).

3.3. Liberación de LTC₄ inducida por las células autoinmunes

En vista de los resultados anteriores y del efecto depresor mediado, al menos en parte, por la SRL-A en corazones infiltrados con células linfomononucleares, se diseñaron ensayos con drogas con efecto inhibitorio o antagonista de la vía lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico. Por un lado se incubaron las aurículas con ANDG (10^{-5} M), ditizona (10^{-5} M) o FPL 55712 ($5 \cdot 10^{-7}$ M) previo al agregado de células mononucleares y se comprobó que el efecto depresor desaparecía (Figura 20 A). Por otro lado, las células se trataron con los inhibidores 30 minutos antes de ser puestas en contacto con las aurículas libres de todo agregado: En este caso, el efecto depresor no se modificó, lo cual habla a favor de un mecanismo puesto en funcionamiento por las células reactivas contra corazón, pero cuyo último efector sería el propio miocardio, tanto en la liberación de leucotrienos como en el órgano blanco de su acción (Figura 20 B).

Además, la confirmación de la liberación de leucotrienos inducida por las células inmunes estuvo dada por una mayor producción de LTC₄ por parte de los corazones normales en

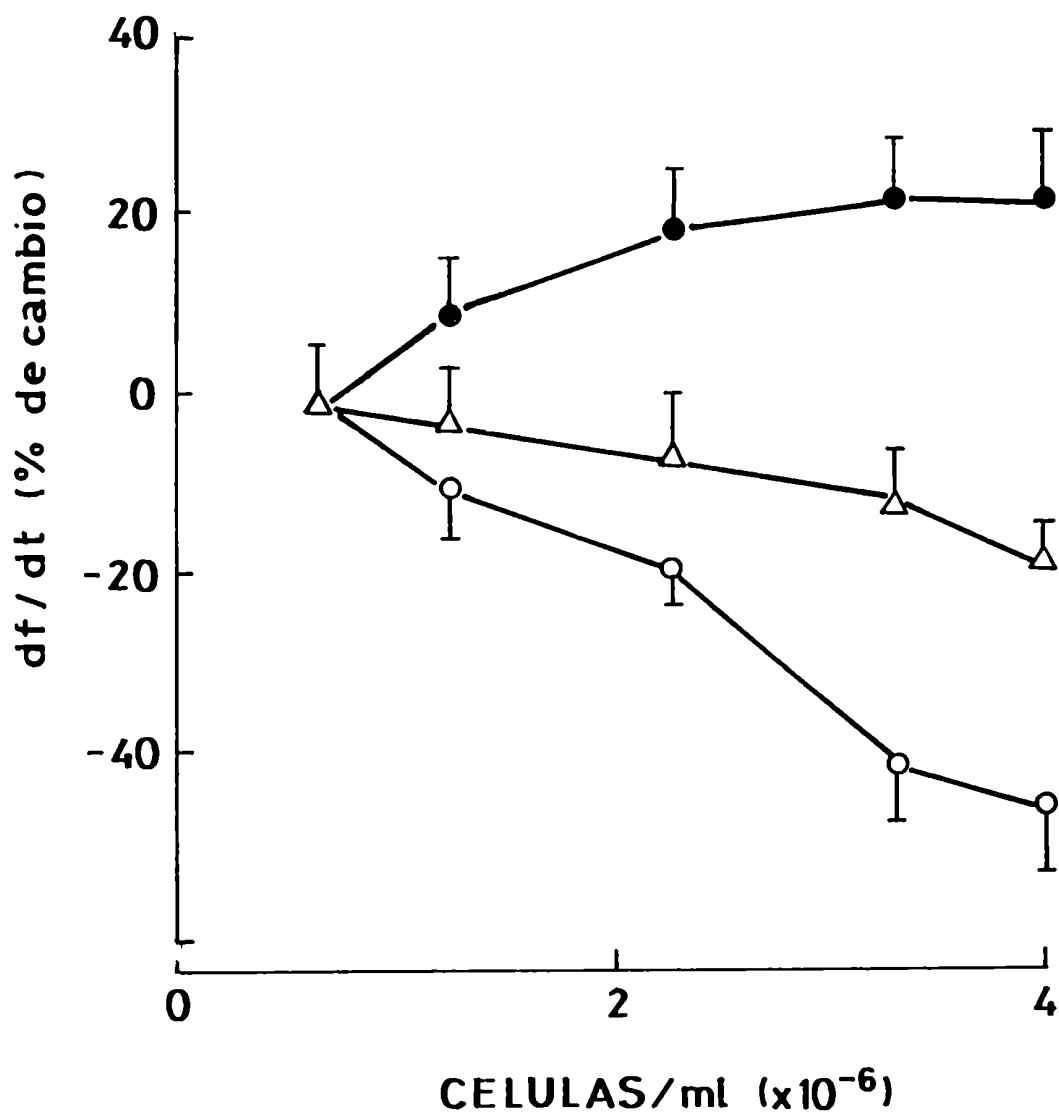


Figura 19: Efecto de las subpoblaciones de células T $Lyt\ 2^+$ y $L3T4^+$ sobre la contractilidad de aurículas normales. Las células T provenientes de animales inmunizados con corazón (\triangle — \triangle) o las fracciones de estas células enriquecidas en las dos subpoblaciones; $L3T4^+$ (O—O) y $Lyt\ 2^+$ (●—●); fueron incubadas 20 minutos con las aurículas normales, al cabo de los cuales se realizaron los registros de dF/dt . Los puntos representan los valores promedio de tres experimentos y las barras, el E.S.

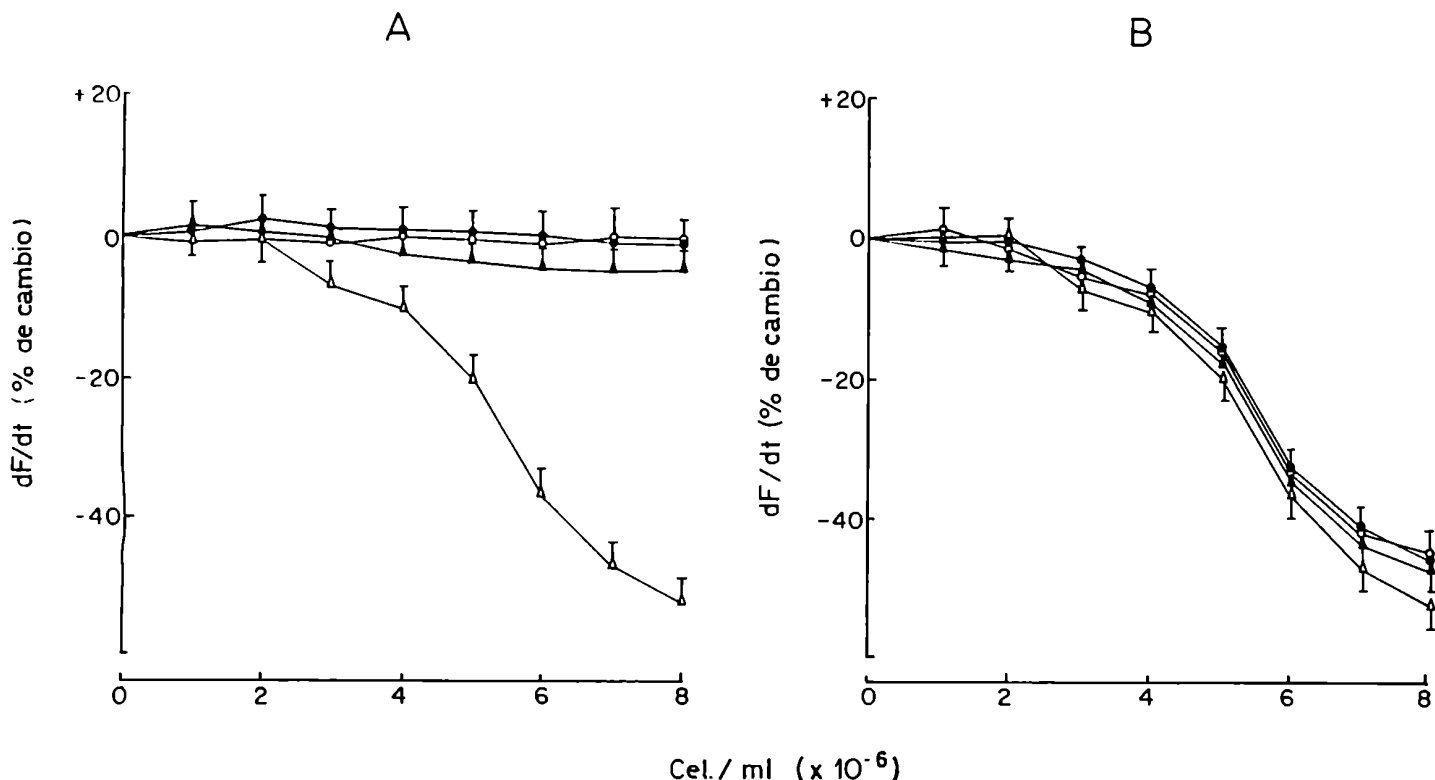


Figura 20: Efecto de los inhibidores de lipoxigenasa sobre la actividad de las células T de ratones inmunizados con corazón sobre aurículas normales. (A): las aurículas normales fueron equilibradas durante 30 minutos en presencia de ditizone (10^{-5} M), (\circ — \circ), ANDG (10^{-5} M) (\blacktriangle — \blacktriangle); FPL 55712 ($5 \cdot 10^{-6}$ M) (\bullet — \bullet), o sin inhibidores (Δ — Δ). Al tiempo 0 se agregaron cantidades crecientes de células y se registró el dF/dt a los 15 minutos. (B): las células T de los ratones del grupo I (inmunizados con corazón) fueron incubadas 30 minutos con las mismas concentraciones de las drogas: los símbolos coinciden con los del panel A. Al tiempo 0 se agregaron las células, previo lavado por centrifugación, a las aurículas normales y se registró la actividad contráctil a los 15 minutos. Los valores representados son las medias \pm E.S. de seis experimentos.

presencia de $4 \cdot 10^7$ células mononucleares de ratones del grupo I. (inmunizados contra corazón), mientras que las de animales controles no fueron efectivas (Figura 21). Nuevamente los inhibidores de lipoxigenasa pero no los de ciclooxigenasa en la aurícula previnieron el efecto de las células inmunes sobre la liberación de LTC₄ (Figura 21).

4. EFFECTOS DE LOS SUEROS E IgG DE RATONES CON MIOCARDITIS AUTOINMUNE SOBRE EL MIOCARDIO

4.1. Estudios sobre los parámetros contráctiles

4.1.1. Efecto de los sueros: las inmunoglobulinas responsables de la actividad sérica

Los sueros de los ratones con miocarditis autoinmune fueron ensayados sobre aurículas normales y se registraron los parámetros contráctiles dF/dt y frecuencia: De 8 sueros estudiados individualmente, todos mostraron un efecto inhibitorio en el dF/dt, 6 de ellos con un efecto máximo mayor de 20 % (Figura 22). La frecuencia, en cambio, sufrió variaciones pequeñas que en ningún caso superaron el 10 % de inhibición (dato no mostrado). Los sueros correspondientes a animales de los grupos II y III no tuvieron efecto sobre la actividad mecánica de las aurículas: Grupo II: dF/dt $4,0 \pm 0,6$ g/s (n=6), grupo III:

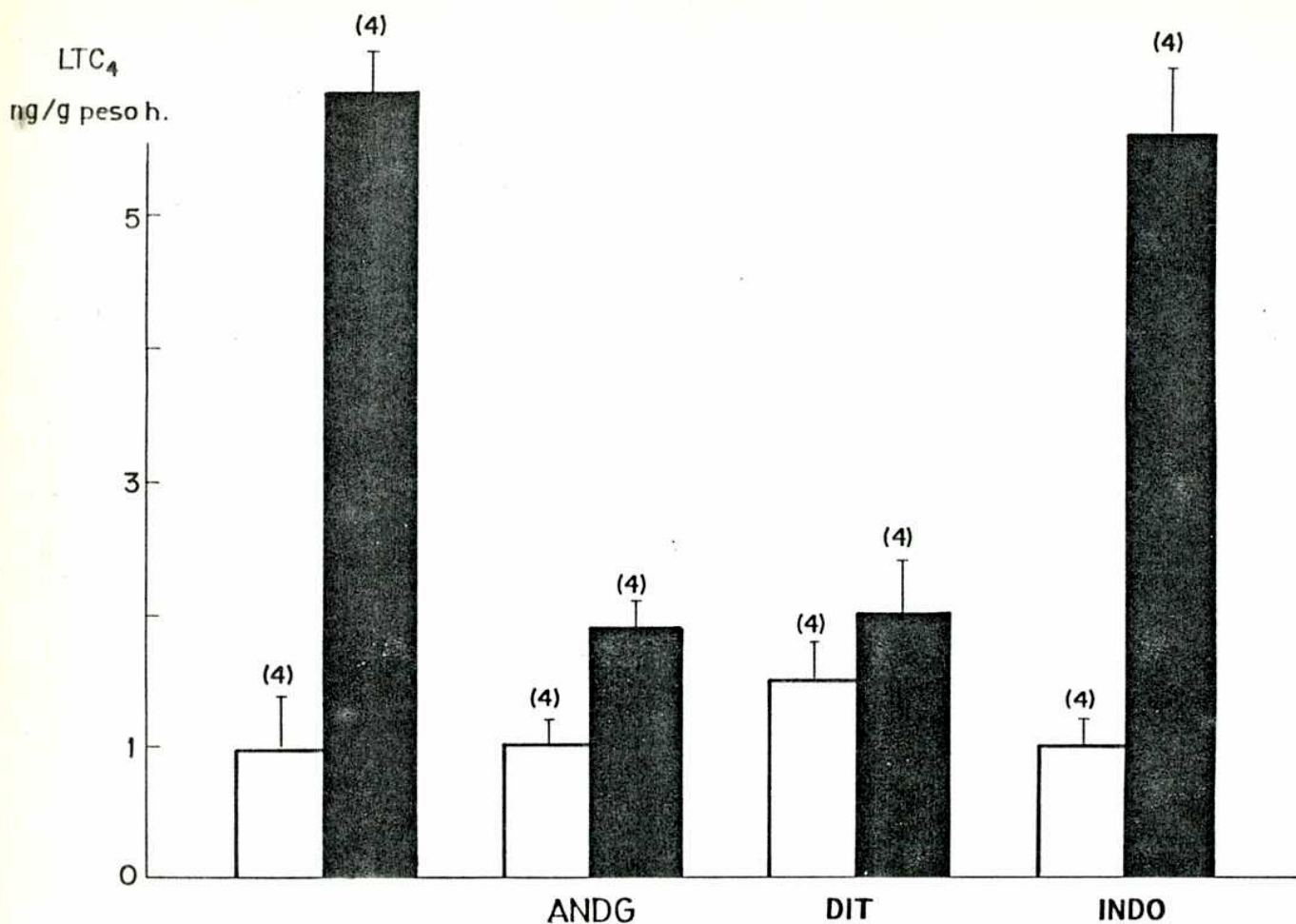


Figura 21: Efecto de las células inmunes sobre la producción de LTC₄ por aurículas normales. Las aurículas fueron incubadas en ausencia o en presencia de inhibidores como el ANDG (10^{-5} M), ditizona, DIT (10^{-5} M) o indometacina, INDO (10^{-6} M) por 30 minutos y luego se agregaron $4 \cdot 10^7$ células mononucleares de bazo de ratones del grupo II (inmunizados con testículo) (□) o del grupo I (inmunizados con corazón) (■). La determinación de LTC₄, medido como ng por g de peso húmedo de las aurículas, se realizó a los 20 minutos en el sobrenadante tras eliminar las aurículas y las células inmunes. Las barras representan el promedio \pm E.S. de las determinaciones realizadas por duplicado que se indican entre paréntesis. Los valores controles de LTC₄ liberado por $4 \cdot 10^7$ células inmunes o normales incubadas solas fueron de $0,3 \pm 0,2$ y $0,2 \pm 0,1$ ng/ $4 \cdot 10^7$ cél., n=4, respectivamente.

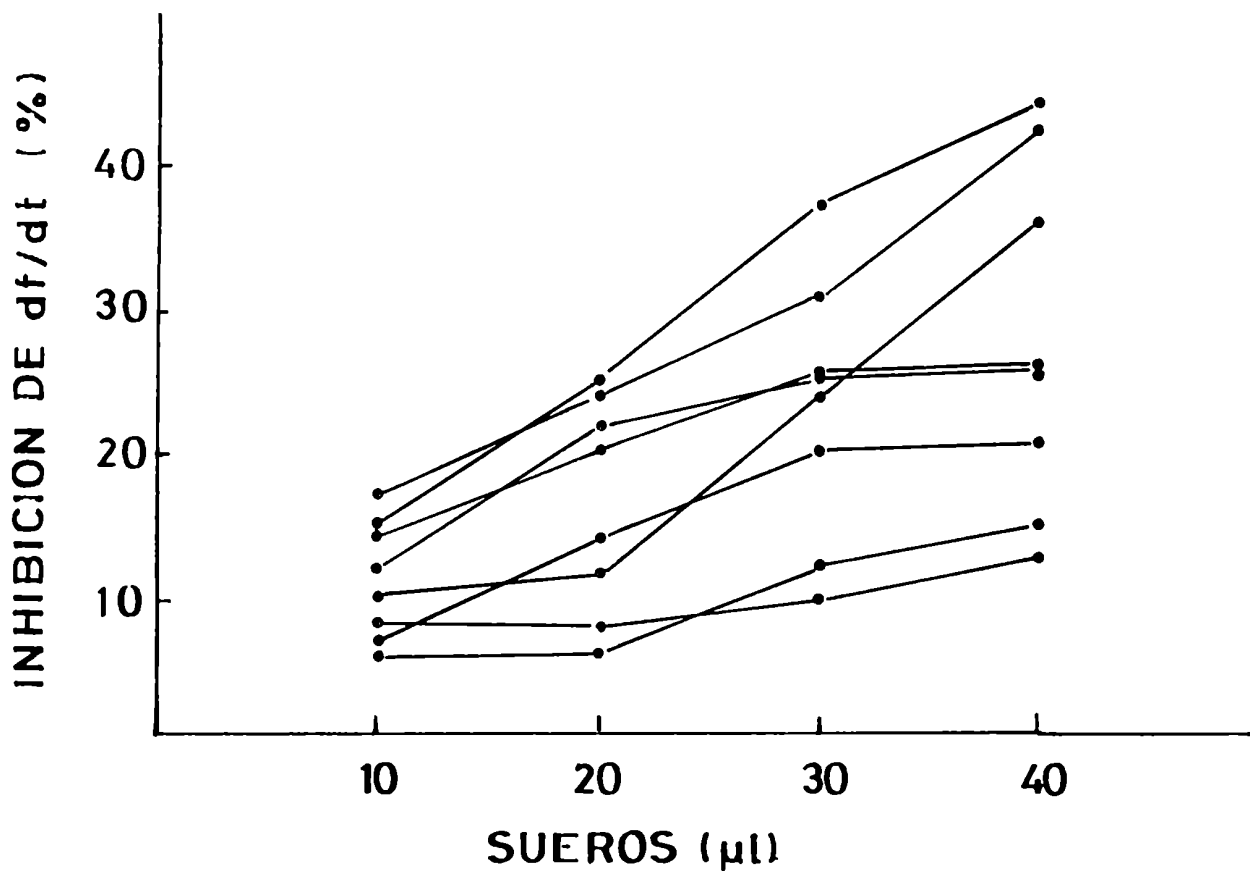


Figura 22: Actividad de los sueros de ratones inmunizados con corazón (grupo I) sobre el df/dt de aurículas normales. Los sueros fueron agregados en volúmenes crecientes y se registró la actividad contráctil luego de 10 minutos de cada adición. Las curvas corresponden a los distintos sueros ensayados por duplicado. Se representó la inhibición de la contractilidad con respecto al tiempo 0, antes del agregado de los sueros.

dF/dt $4,1 \pm 0,5$ g/s (n=6), normales: $4,4 \pm 0,4$ g/s (n=14).

Con el objeto de identificar los componentes séricos responsables del efecto observado sobre el miocardio se separó la fracción de inmunoglobulinas y dentro de ellas, la IgG, y se probó su capacidad de modificar la contractilidad auricular. Las inmunoglobulinas totales indujeron un efecto depresor máximo sobre el dF/dt a una concentración de $40 \mu\text{g/ml}$ y este fue de $30,6 \pm 6,8 \%$ (n=6). La fracción IgG aislada, por su parte, tuvo acción inhibitoria, en forma concentración dependiente, sobre la contractilidad, mientras que las IgG provenientes de los grupos II y III, fueron inefectivas en el sistema (Figura 23).

4.1.2. Caracterización del efecto depresor de la IgG autoinmune

Los ensayos se diseñaron con el objeto de conocer la posible existencia de una relación entre el efecto depresor de la actividad cardíaca, inducido por la IgG, y los sistemas regulatorios de esta actividad. Para ello se repitieron los experimentos con IgG autoinmune sobre aurículas normales, ahora en presencia de antagonistas de los receptores beta adrenergicos y colinérgicos muscarinicos.

El efecto depresor de la IgG autoinmune fue antagonizado por atropina, un antagonista colinérgico muscarinico pero no se

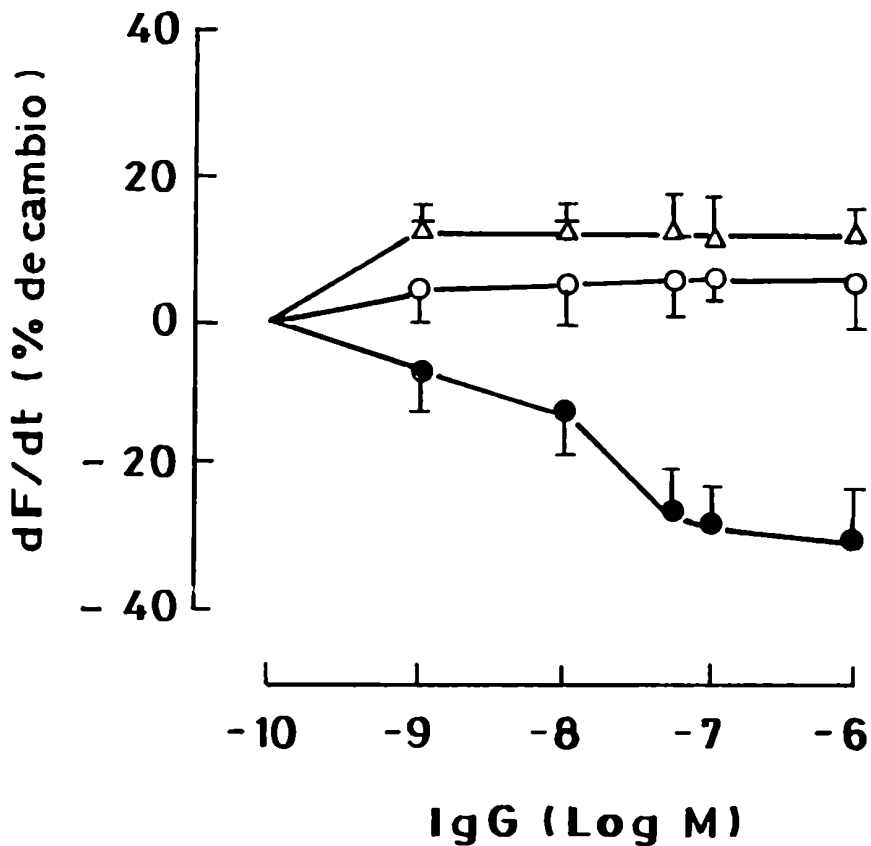


Figura 23: Efecto de la fracción IgG sobre la contractilidad de aurículas normales. Distintas concentraciones de IgG de ratones del grupo I (inmunizados con corazón) (●—●), del grupo II (inmunizados con testículo) (○—○) o del grupo III (adyuvante) (Δ—Δ) se pusieron en contacto 10 minutos con aurículas normales de ratón y se registró el dF/dt. Se representó el % de cambio en los valores de dF/dt después del agregado de IgG con respecto a los mismos en el tiempo 0. Los puntos representan los valores promedio de % de cambio y las barras, los errores estándar de cinco experimentos.

modificó significativamente en presencia de un bloqueante del receptor beta adrenérgico, el propranolol (Figura 24).

Por otro lado, se ensayó la IgG autoinmune a una concentración que por sí sola no tenía efecto inhibitorio, en presencia de los agonistas colinérgicos muscarínicos acetilcolina y carbacol sobre aurículas normales. Estos resultados indicaron una interacción de la IgG con los agonistas muscarínicos que, a juzgar por los valores de E_{max} y CE_{50} calculados luego del análisis de Lineweaver-Burk, es de tipo no-competitivo: inhibición del efecto máximo sin modificaciones en la afinidad. (Figura 25 y Tabla 2).

Por su parte, las pruebas con IgG autoinmune en presencia de norepinefrina (agonista beta adrenérgico) indicaron una inhibición por parte de la IgG del efecto del agonista que, en coincidencia con las observaciones anteriores, resultó de tipo no-competitivo (IgG control: $E_{max} = 10,7 \pm 0,9$ g/s y $CE_{50} = 1,4 \pm 0,2$ nM; IgG autoinmune: $E_{max} = 6,7 \pm 0,6$ g/s y $CE_{50} = 1,6 \pm 0,2$ nM) (Figura 26). Ese efecto depresor de la actividad beta adrenérgica sólo pudo bloquearse en un 31 ± 6 % con atropina (n=7). Estos resultados estarían indicando que la IgG autoinmune no sólo compromete al receptor muscarínico, sino también al receptor beta adrenérgico del miocardio.

4.2. Niveles de nucleótidos cíclicos

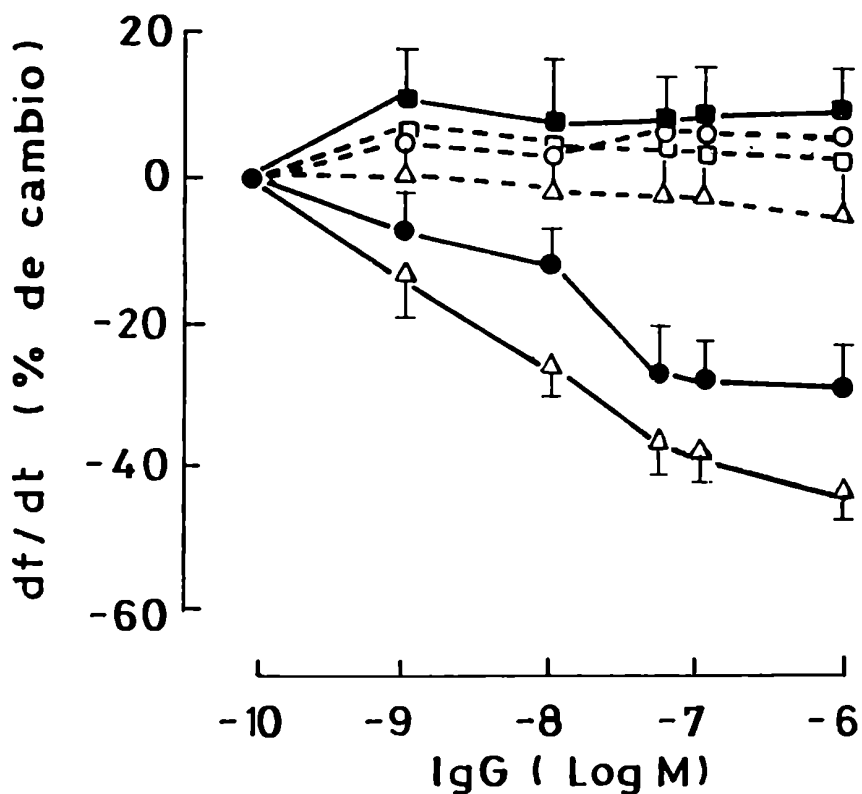


Figura 24: Acción de bloqueantes de receptores beta adrenérgicos y colinérgicos muscarínicos sobre el efecto depresor de la IgG autoinmune. Distintas concentraciones de IgG de ratones inmunizados con corazón (●—●) o de ratones controles del grupo II (○---○) fueron agregadas a aurículas normales en ausencia de drogas bloqueantes. Las mismas concentraciones fueron ensayadas sobre aurículas incubadas por 30 minutos con atropina 10^{-7} M: IgG autoinmune (▲—▲), IgG control (□---□); o con propranolol 10^{-7} M : IgG autoinmune (▲—▲), IgG control (△---△). Los valores representados son las medias \pm E.S. de cinco experimentos.

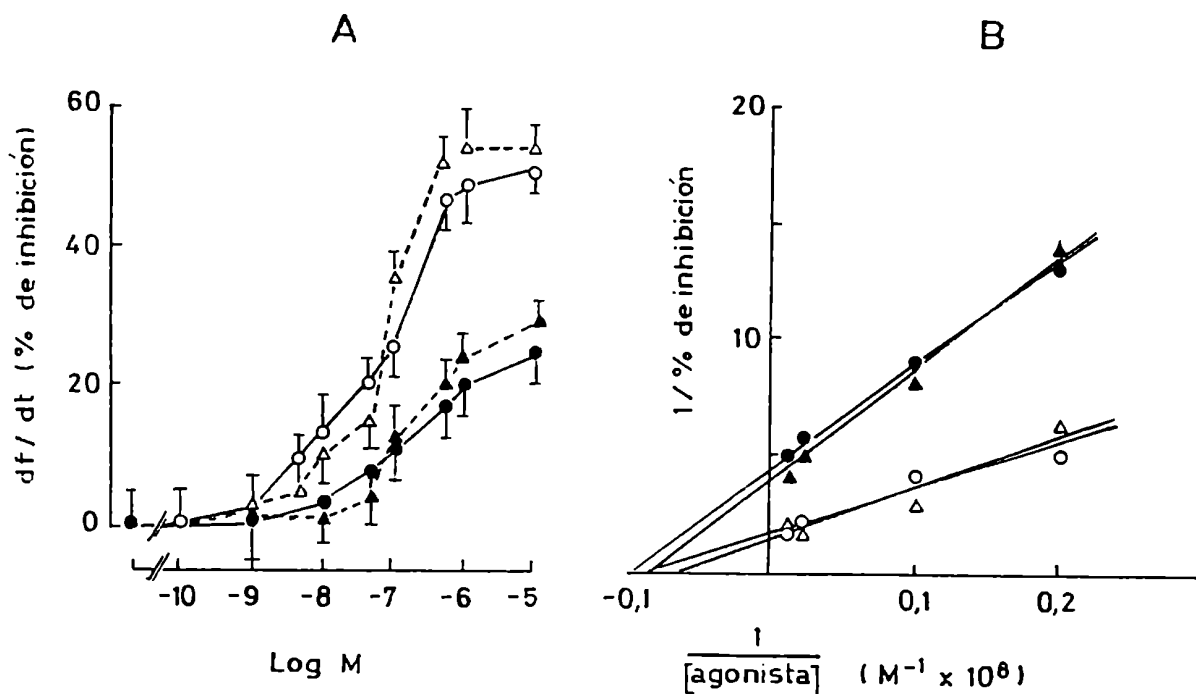


Figura 25: Efecto de la IgG autoinmune sobre la actividad colinérgica muscarínica en aurículas normales. (A): Se realizaron curvas concentración-respuesta de acetilcolina (círculos) o carbacol (triángulos) en presencia de 10^{-9} M de IgG autoinmune (símbolos llenos) o de IgG de ratones inmunizados con testículo (símbolos vacíos). La IgG se agregó 30 minutos antes de agregar la primera concentración de los agonistas, los registros se realizaron cada 3 minutos y se graficó el % de inhibición del dF/dt con respecto al valor de éste antes del agregado del agonista. (B): Análisis de Lineweaver-Burk de las curvas representadas en (A).

Tabla 2: Valores de CE_{50} y E_{max} calculados a partir de los gráficos de Lineweaver-Burk de la figura 25.

	Acetilcolina		Carbacol	
	CE_{50} ($M \cdot 10^7$)	E_{max} (%)	CE_{50} ($M \cdot 10^7$)	E_{max} (%)
IgG control (III)	$1,12 \pm 0,12$	66 ± 11	$1,16 \pm 0,11$	58 ± 9
IgG autoi. (I)	$1,41 \pm 0,16$	24 ± 8	$1,05 \pm 0,13$	23 ± 7

Las curvas concentración-respuesta de los agonistas se realizaron en presencia de 10^{-9} M de IgG de los grupos que se indican. (I), inmunizados con corazón ; (III), adyuvante; las cuales se agregaron 30 minutos antes de la primera concentración del agonista. Los valores se calcularon de las rectas de la figura 25 (B) como se describió en Materiales y Métodos.

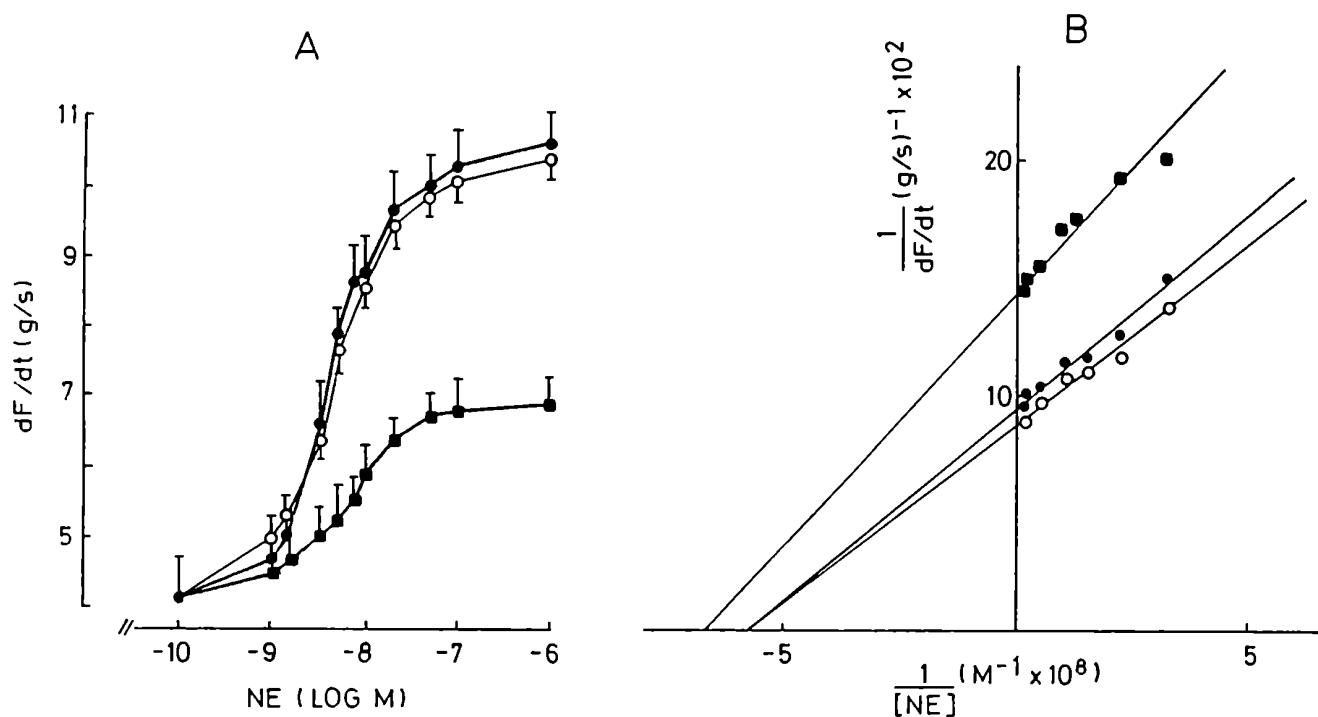


Figura 26: Efecto de la IgG autoinmune sobre la actividad del agonista beta adrenérgico norepinefrina. (A): Se realizaron curvas concentración-respuesta de norepinefrina sobre aurículas normales que habían sido incubadas 30 minutos con IgG de los grupos controles II (●—●) y IV (○—○) o de ratones inmunizados con corazón (■—■) en concentración 10^{-7} M. Los registros se efectuaron a los 2 minutos de agregada cada concentración de norepinefrina y se graficó el valor de dF/dt para el promedio de seis experimentos similares. Las barras indican los E.S. (B): Análisis de las curvas de la figura 26 (A) según Lineweaver-Burk.

Los resultados anteriores sugerían una interacción de la IgG autoinmune con los receptores beta adrenérgicos y colinérgicos muscarínicos del miocardio: Esta posibilidad fue entonces abordada mediante otros experimentos que consistieron en determinar si la acción de la IgG autoinmune involucraba cambios en los niveles de nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc. Estos parámetros evalúan, en alguna medida, la actividad cardíaca regulada por el sistema nervioso autónomo y, como tales, fueron medidos en condiciones basales o en respuesta a agonistas, en presencia de IgG autoinmune.

4.2.1. Efecto de la IgG autoinmune sobre los niveles de AMPc y GMPc. Dependencia del tiempo y de la concentración

Se determinó el contenido de AMPc y GMPc de aurículas normales, previamente incubadas con diferentes concentraciones de IgG controles y autoinmune, a los 2, 5, 10 y 20 minutos. En el caso de GMPc se midieron los niveles del nucleótido en condiciones basales y en presencia de IgG, mientras que con AMPc se estudiaron las modificaciones tanto de los niveles basales, como de aquellos estimulados por un agonista beta adrenérgico. En este sentido, los valores de AMPc de las aurículas previamente estimuladas resultaron más reproducibles que los basales y, por lo tanto, los efectos de la IgG sobre estos niveles, más confiables.

Para ambos, AMPc y GMPc, el máximo efecto de la IgG autoinmune -inhibición de la acumulación de AMPc y estimulación de GMPc- se observó a partir de los 10 minutos y persistió hasta los 20 minutos (Figura 27). Además éste fue dependiente de la concentración de anticuerpo y así el mayor efecto se puso de manifiesto con 10^{-7} M de IgG.

4.2.2. Caracterización farmacológica del efecto de la IgG autoinmune sobre los niveles de nucleótidos cíclicos

En vista de los efectos inducidos por la IgG autoinmune sobre los niveles de AMPc y GMPc, se estudió la acción de los ligandos colinérgicos muscarínicos carbacol y atropina en el sistema.

La ocupación de los receptores por el antagonista atropina fue más efectiva para impedir la acción de la IgG sobre los niveles de GMPc que para modificar la acción inhibitoria promovida por la IgG en los niveles de AMPc (Tabla 3).

Con respecto a la interacción con el agonista, la IgG autoinmune 10^{-9} M -concentración que por sí sola no tenía efecto sobre los niveles de nucleótidos cíclicos de referencia- fue capaz de impedir la actividad del carbacol (Tabla 3). Nuevamente, estos efectos fueron más pronunciados en el caso de GMPc.

El efecto máximo de la IgG autoinmune en concentración $5 \cdot 10^{-7}$ M fue comparable con el que se obtuvo con 10^{-7} M de

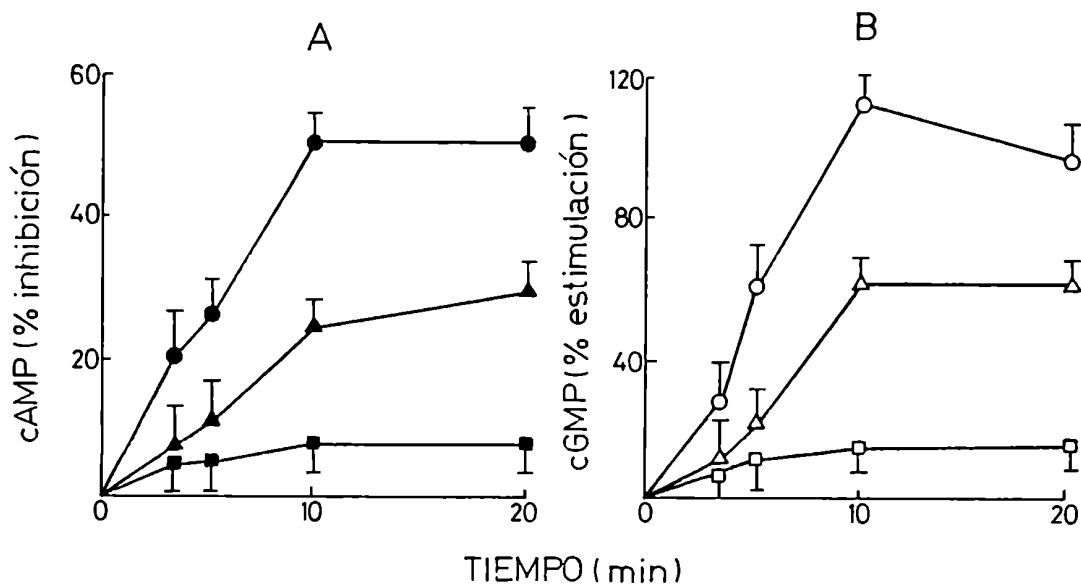


Figura 27: Dependencia del tiempo del efecto de la IgG autoinmune sobre los niveles de nucleótidos cíclicos. La IgG autoinmune fue incubada en concentración 10^{-9} (cuadrados), 10^{-8} (triángulos) y 10^{-7} M (círculos) con aurículas normales en K.R.B. y se midieron los niveles de AMPc (A) y GMPc (B) a distintos tiempos. Los valores graficados expresan el % de cambio en los pmoles de cada nucleótido por g de peso húmedo de las aurículas con respecto al valor obtenido con IgG control del grupo II a la misma concentración y en el mismo tiempo. Los valores graficados son las medias \pm E.S. de cuatro experimentos.

Tabla 3: Efecto de la IgG autoinmune sobre los niveles de AMPc estimulados por isoproterenol y GMPc intracelulares.

AGREGADOS	GMPc (pmol/g peso húmedo)	AMPc
	35,0 ± 2,2	1086 ± 73
IgG control (II)	33,3 ± 2,6	984 ± 56
IgG control (IV)	34,2 ± 2,9	1109 ± 84
IgG autoi. (I)	84,5 ± 7,6	773 ± 37
IgG autoi. + atropina	50,1 ± 3,2	833 ± 72
Carbacol	95,1 ± 3,2	716 ± 41
IgG autoi. + carbacol	33.3 ± 2,4	865 ± 62

Los valores tabulados son las medias ± E.S de cinco experimentos realizados por duplicado. Se midieron los niveles de los nucleotidos en los tejidos luego de 10 minutos de reacción con $5 \cdot 10^{-7}$ M de las IgG (grupos II, inmunizados con testículo; IV, no inmunizados y I, inmunizados con corazón) o carbacol 10^{-7} M. La atropina se incluyó en el medio de incubación 30 minutos antes de los otros agentes agregados y a una concentración de 10^{-7} M. En las determinaciones de AMPc, los corazones fueron incubados previamente con 10^{-7} M de isoproterenol y luego se prosiguió con los demás reactivos. El valor basal de AMPc antes de la estimulación con isoproterenol fue 486 ± 47 pmol/g de peso húmedo. En los experimentos con IgG autoinmune y carbacol, la misma se empleó a una concentración por debajo de la umbral, 10^{-9} M.

carbacol.

INTERACCION DE LA IgG AUTOINMUNE CON LOS RECEPTORES BETA
ADRENERGICOS Y COLINERGICOS MUSCARINICOS EN MEMBRANAS
CARDIACAS MURINAS

5.1. Receptores beta adrenérgicos

La identificación de receptores beta adrenérgicos en membranas de aurícula de ratón con un ligando específico, el [³H]-DHA, fue el paso previo a los ensayos de desplazamiento con la IgG autoinmune.

Las experiencias se realizaron según las pautas descritas en Materiales y Métodos y, en esas condiciones, se identificó una única población de receptores beta adrenérgicos en la fracción microsomal. Los parámetros $K_D = 1,8 \pm 0,6$ nM y $B_{max} = 73,4 \pm 10,2$ fmol/mg de proteínas fueron calculados a partir de las curvas de saturación y posterior análisis de Scatchard.

5.1.1. Ensayos de desplazamiento

Los ensayos de unión específica de un ligando beta adrenérgico específico marcado radioactivamente aportaron nuevas evidencias acerca de la interacción de la IgG autoinmune con estos receptores sobre membranas de aurículas murinas.

La inhibición en la unión del ligando [^3H]-DHA a la fracción microsomal de aurículas normales de ratón alcanzó un efecto máximo de un 60 % aproximadamente con 10^{-6} M de IgG autoinmune y se presentó como un fenómeno dependiente de la concentración del anticuerpo (Figura 28). Las IgG correspondientes a los controles (grupos II y III) no tuvieron efecto como tampoco la IgG normal, cuyos valores fueron tomados como 100 % de unión específica (Tabla 4). La IgG autoinmune absorbida con miosina presentó una inhibición de $54,6 \pm 10,9$ %, $n=4$; a una concentración de $5 \cdot 10^{-8}$ M y $59,6 \pm 9,7$ %, $n=4$; si la concentración era $5 \cdot 10^{-7}$ M.

Los ensayos de desplazamiento se realizaron también con isoproterenol y propranolol como controles de la especificidad de la unión del ligando radioactivo. De la comparación de las curvas de inhibición surge que el efecto máximo de la IgG es similar al de $5 \cdot 10^{-8}$ M de isoproterenol (Figura 28).

5.1.2. Cálculo de los parámetros de unión en presencia de la IgG autoinmune

Con el fin de estudiar el tipo de interacción de la IgG con los receptores beta adrenérgicos de la fracción microsomal, se realizaron curvas de saturación con concentraciones crecientes de [^3H]-DHA y se calcularon los parámetros de unión.

Se incubaron las membranas con IgG autoinmune o control

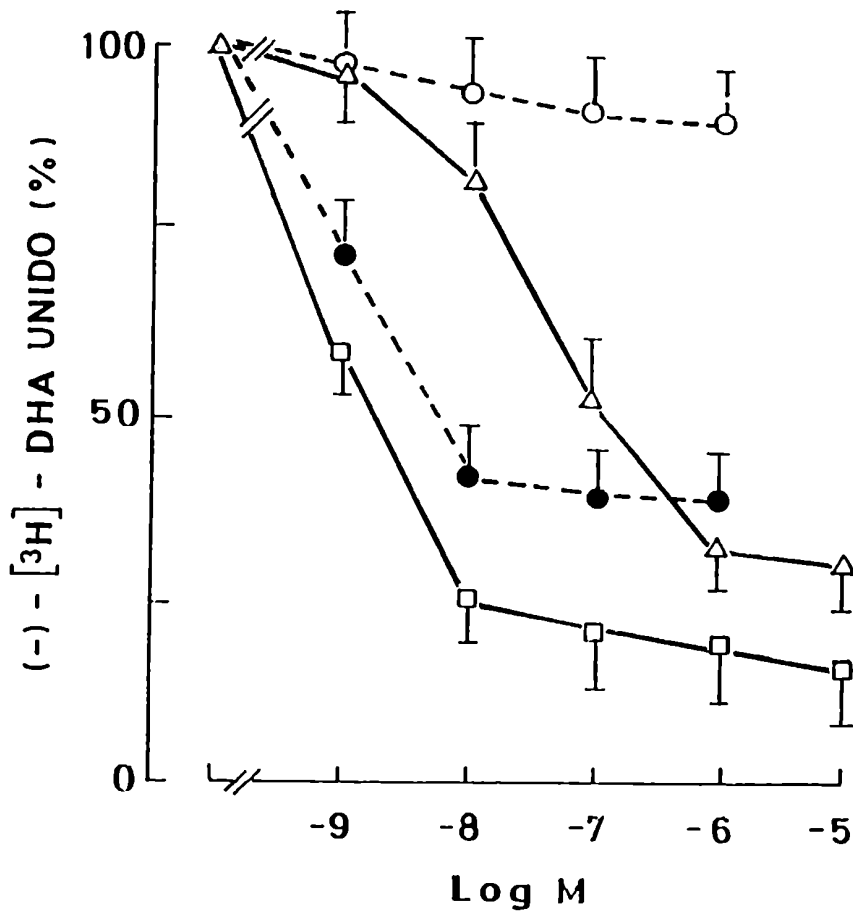


Figura 28: Efecto de la IgG autoinmune, de isoproterenol y de propranolol sobre la unión del [^3H]-DHA a membranas de aurículas normales. Concentraciones crecientes de IgG autoinmune (●---●), IgG control del grupo II (○---○), (-)-isoproterenol (Δ---Δ) o (-) propranolol (□---□) se incubaron en las condiciones detalladas en Materiales y Métodos y luego se realizó el ensayo de unión específica con [^3H]-DHA. Los valores graficados indican el % de [^3H]-DHA unido en presencia de estos agentes con respecto al valor del ligando unido a las membranas sin agregado alguno ($28,6 \pm 3,8$ fmol/mg prot., $n=8$) y tomado como 100 % de unión. Estos valores son las medias \pm E.S. de seis experimentos semejantes.

Tabla 4: Efecto de las IgG de los grupos controles sobre la unión del [³H]-DHA a las membranas cardíacas.

AGREGADOS	[³ H]-DHA unido (fmol/mg prot.)	n
	31,6 ± 3,4	14
IgG control (grupo II)	29,5 ± 5,2	6
IgG control (grupo III)	30,7 ± 6,4	6
IgG control (grupo IV)	33,4 ± 5,2	8

Las IgG en concentración $5 \cdot 10^{-7}$ M se incubaron 30 minutos con las membranas cardíacas y luego se realizó el ensayo de unión específica con 2 nM de [³H]-DHA en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los valores tabulados son los promedios ± E.S. de los experimentos indicados entre paréntesis.

(10^{-7} M), al cabo de 30 minutos se separó la IgG en exceso y se procedió al ensayo de unión de [3 H]-DHA con concentraciones crecientes de este ligando según se describió en Materiales y Métodos (Figura 29).

A partir de las curvas de saturación y su linearización mediante el análisis de Scatchard, se calcularon los parámetros de unión del [3 H]-DHA, B_{max} y K_D (Tabla 5). Estos valores indican una interacción de tipo no competitivo por parte de la IgG autoinmune, con disminución del número máximo de sitios sin variación del K_D .

5.2. Receptores colinérgicos muscarínicos

La participación de receptores colinérgicos muscarínicos en el efecto de la IgG autoinmune también fue investigado a través de ensayos de unión específica del antagonista [3 H]-QNB. Los mismos se llevaron a cabo sobre membranas de aurículas de ratón normal, previa identificación de los receptores.

El aislamiento de la fracción microsomal de las aurículas de ratón y las incubaciones para los ensayos de unión se realizaron según la técnica descrita en Materiales y Métodos. En estas membranas pudo identificarse una población única de receptores colinérgicos muscarínicos cuyos parámetros de unión, calculados mediante un análisis de Scatchard, fueron $K_D = 0,23 \pm 0,02$ nM y $B_{max} = 579 \pm 28$ fmol/mg de proteínas.

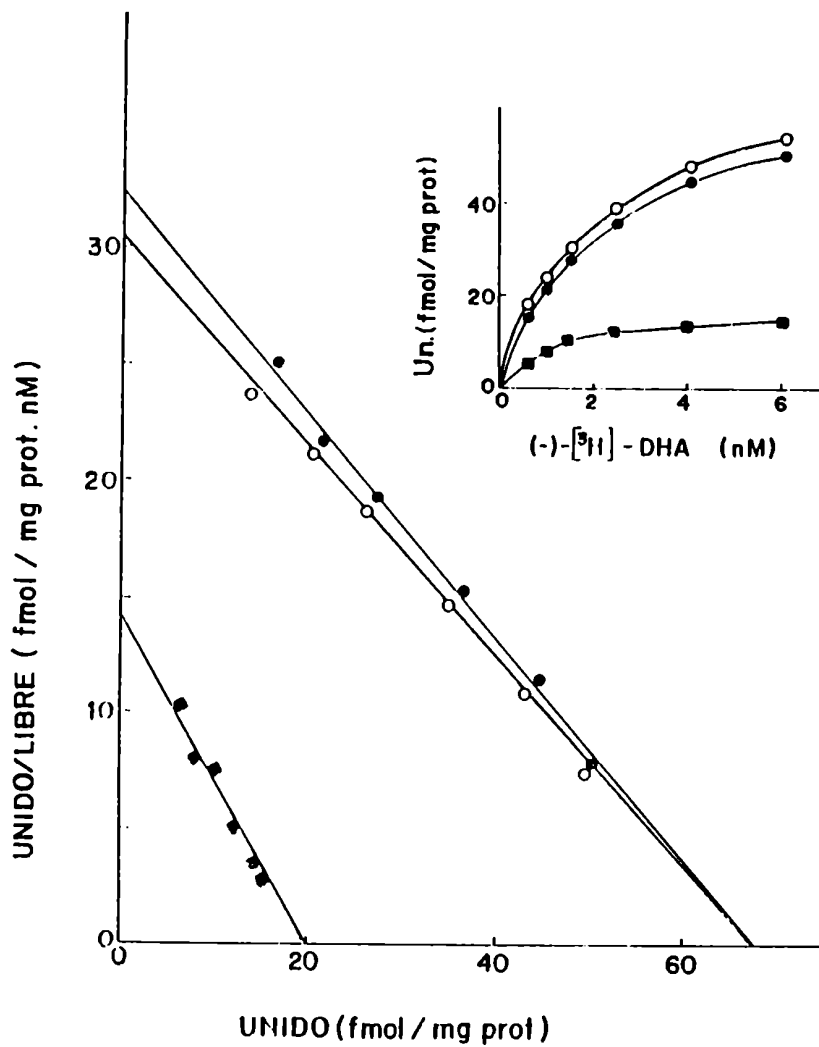


Figura 29: Curvas de saturación y análisis de Scatchard con [³H]-DHA en membranas de aurículas normales: Efecto de la IgG autoinmune. Las membranas previamente incubadas con una concentración fija (10^{-7} M) de IgG de los ratones inmunizados con corazón (■—■) o de los grupos controles II (●—●) y IV (○—○) fueron sometidas a un ensayo típico de unión de [³H]-DHA en concentraciones 0,6 a 6 nM. En el gráfico inserto se graficó el [³H]-DHA unido en función del ligando agregado y corresponde a un experimento representativo de seis similares. El gráfico principal corresponde al análisis de Scatchard del gráfico anterior.

Tabla 5: Parámetros de unión de [³H]-DHA: Efectos de la IgG autoinmune y controles.

	K_D (nM)	B_{max} (fmol/mg prot)
IgG (grupo IV)	2,4 ± 0,3	68,1 ± 10,8
IgG (grupo II)	2,1 ± 0,5	67,5 ± 11,6
IgG (grupo I)	1,9 ± 0,4	20,4 ± 4,7

Los valores tabulados fueron calculados de los gráficos de Scatchard obtenidos a partir de curvas de saturación como las de la figura 29 (inserto) y para ello se procedió como ya se ha descrito en Materiales y Métodos. Grupo IV, ratones no inmunizados; grupo II, inmunizados con testículo y grupo I, inmunizados con corazón.

5.2.1. Ensayos de desplazamiento

Una vez identificados los receptores colinérgicos muscarínicos, se realizaron pruebas de desplazamiento de la unión del [^3H]-QNB con agonistas y antagonistas, así como también con las IgG a distintos tiempos: En la figura 30, se puede observar el efecto inhibitorio de la IgG autoinmune y su dependencia del tiempo de incubación previo al ensayo.

Por otra parte, la inhibición inducida por la IgG autoinmune resultó dependiente de la concentración de proteínas agregada, con un efecto máximo semejante al producido por carbacol ($5 \cdot 10^{-7}$ M) o atropina ($3 \cdot 10^{-9}$ M) (Figura 31).

5.2.2. Cálculo de los parámetros de unión: Efecto de la IgG autoinmune

Como en el sistema beta adrenérgico, el cálculo de los parámetros de unión K_D y B_{max} se realizó a partir de las rectas obtenidas mediante el análisis de Scatchard de las curvas de saturación con el [^3H]-QNB. Nuevamente, se incubaron las membranas con la IgG autoinmune y controles y, tras eliminar la IgG en exceso, se pusieron en contacto con concentraciones crecientes del ligando marcado (Figura 32). Los valores de K_D y B_{max} calculados en cada situación experimental se hallan en la Tabla 6. La presencia de IgG autoinmune fue capaz de modificar -

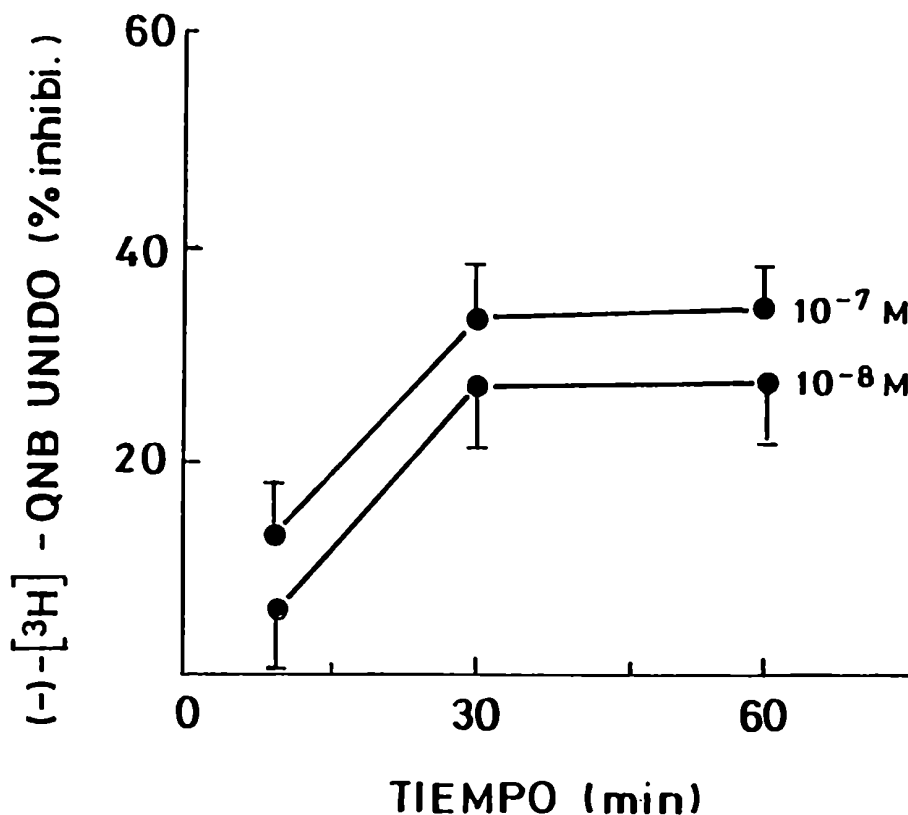


Figura 30: Dependencia del tiempo en el efecto de la IgG autoinmune sobre la unión del [³H]-QNB a membranas cardiacas. La IgG autoinmune en concentración 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M fue incubada con las membranas de aurículas de ratón durante distintos tiempos antes de llevar a cabo el ensayo de unión del [³H]-QNB (0,3 nM). Los valores representan los promedios ± E.S. de cuatro experimentos similares y corresponden a los % de inhibición de la unión del [³H]-QNB tomando como control el efecto de la IgG normal para cada concentración y tiempo.

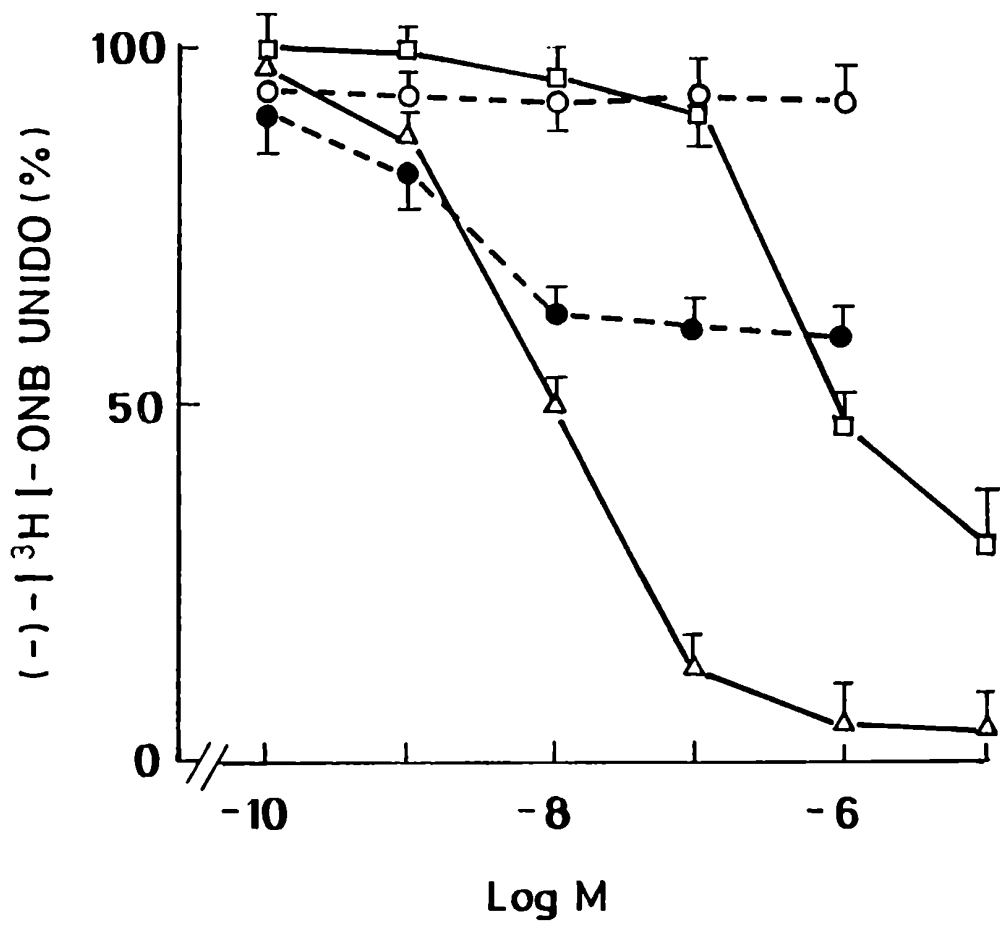


Figura 31: Dependencia de la concentración en el efecto de la IgG autoinmune sobre la union del [³H]-QNB. Concentraciones crecientes de IgG autoinmune del grupo I (inmunizados con corazón) (●---●), IgG control del grupo II (○---○), carbacol (□—□) o atropina (Δ—Δ) fueron incubados con las membranas cardiacas en presencia de una concentración fija de [³H]-QNB (0,3 nM). Se calculó el % de unión del ligando radioactivo en cada punto con respecto al 100 % representado por el [³H]-QNB unido en ausencia de todo agregado (306 ± 19,4 fmol/mg prot., n=6). Los valores graficados corresponden al promedio ± E.S. de seis experimentos semejantes.

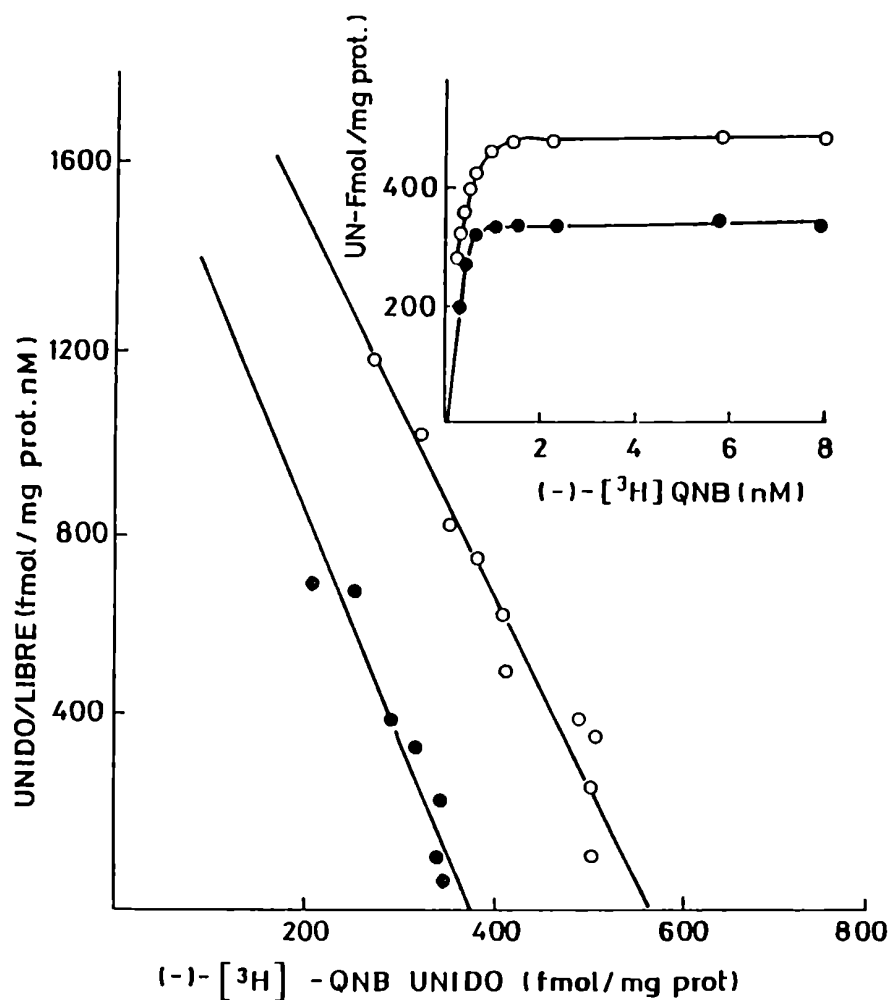


Figura 32: Curvas de saturación y análisis de Scatchard de [³H]-QNB a membranas cardiacas: Efecto de la IgG autoinmune. Se realizaron curvas de saturación con [³H]-QNB (0,1 a 5 nM) en presencia (●—●) o ausencia (○—○) de IgG de ratones inmunizados con corazón (5.10^{-7} M) (gráfico inserto). Las curvas se analizaron según Scatchard (gráfico central). Estos gráficos corresponden a un experimento típico, semejante a otros cinco.

Tabla 6: Parámetros de unión de [³H]-QNB a las membranas cardíacas de ratón. Efecto de las IgG autoinmune y controles.

IgG	K _D (nM)	Bmax (fmol/mg prot)
Control II	0,23 ± 0,02	579 ± 28
Control IV	0,25 ± 0,03	582 ± 30
Autoi. I	0,21 ± 0,02	379 ± 20

Los valores tabulados fueron calculados a partir del análisis de Scatchard de curvas de saturación como la de la figura 32. Las IgG controles II (inmunizados con testículo), IV (no inmunizados) y la IgG autoi. (inmunizados con corazón) fueron incubadas con las membranas 30 minutos antes del ensayo de unión de [³H]-QNB, a una concentración de $5 \cdot 10^{-7}$ M. Estos valores corresponden a los promedios de los K_D y Bmax obtenidos en cinco experimentos ± E.S.

disminuir- el número máximo de sitios sin variar la afinidad, lo cual coincide con un mecanismo no competitivo de interacción. Además, la absorción con miosina no modificó el efecto de la IgG autoinmune, como indican los valores de $K_D = 0,22 \pm 0,03$ nM y $B_{max} = 352 \pm 15$ fmol/mg prot., $n=5$, calculados en presencia de $5 \cdot 10^{-7}$ M de IgG autoinmune absorbida.

6. ESTUDIOS DE ESPECIFICIDAD

6.1. Especificidad de especie

Con el objeto de determinar la existencia o no de especificidad de especie, se trabajó con aurículas de rata y cobayo en las que se realizaron estudios de unión específica con [3 H]-DHA y [3 H]-QNB. En ambos sistemas, el efecto de la IgG autoinmune se manifestó a las dos concentraciones usadas, tanto en rata como en cobayo (Tabla 7).

6.2. Especificidad de órgano

Esta se evaluó sobre tejidos murinos distintos del músculo cardíaco, que presentan una población homogénea de receptores beta adrenérgicos o colinérgicos muscarínicos. Para ello se emplearon membranas de células linfomononucleares de bazo y adipocitos (con receptores beta adrenérgicos) y de vejiga (con

Tabla 7: Inhibición de la unión de [³H]-DHA y [³H]-QNB por las IgG autoinmune y control en aurículas de distintas especies.

IgG	ratón	rata	cobayo
[³H]-DHA			
grupo I ($5 \cdot 10^{-8}$ M)	62 ± 9	46 ± 8	38 ± 7
grupo I ($5 \cdot 10^{-7}$ M)	64 ± 10	53 ± 6	36 ± 10
grupo III ($5 \cdot 10^{-7}$ M)	12 ± 8	10 ± 6	6 ± 4
[³H]-QNB			
grupo I ($5 \cdot 10^{-8}$ M)	39 ± 7	26 ± 5	23 ± 5
grupo I ($5 \cdot 10^{-7}$ M)	40 ± 6	31 ± 8	30 ± 6
grupo III ($5 \cdot 10^{-7}$ M)	7 ± 4	5 ± 4	6 ± 4

Las IgG provenientes de ratones de los grupos I (inmunizados con corazón) y III (adyuvante) fueron incubadas con las membranas de aurículas de rata o cobayo a las concentraciones indicadas, por 30 minutos antes de realizar el ensayo de unión de cada ligando radioactivo. Estos se realizaron como se indicó en Materiales y Métodos. Cada valor corresponde al promedio ± E.S. de los porcentajes de inhibición con respecto al control de membranas solas de cuatro experimentos (rata y cobayo) y 6 (ratón). [³H]-DHA 2 nM; [³H]-QNB 0,3 nM.

receptores colinérgicos muscarínicos) y se realizaron ensayos de inhibición de la unión específica de [³H]-DHA y [³H]-QNB por concentraciones crecientes de IgG (Figura 33 A y B). La IgG autoinmune no fue capaz de desplazar la unión del ligando beta adrenérgico a los linfocitos (Figura 33 A) como tampoco en adipocitos: En estos últimos, la inhibición máxima alcanzó el $9 \pm 7 \%$ (n=4) con 10^{-6} M de IgG autoinmune.

En los ensayos con [³H]-QNB, la IgG autoinmune no fue capaz de inhibir la unión de ese ligando, situación semejante a lo observado en el sistema beta adrenérgico (Figura 33 B).

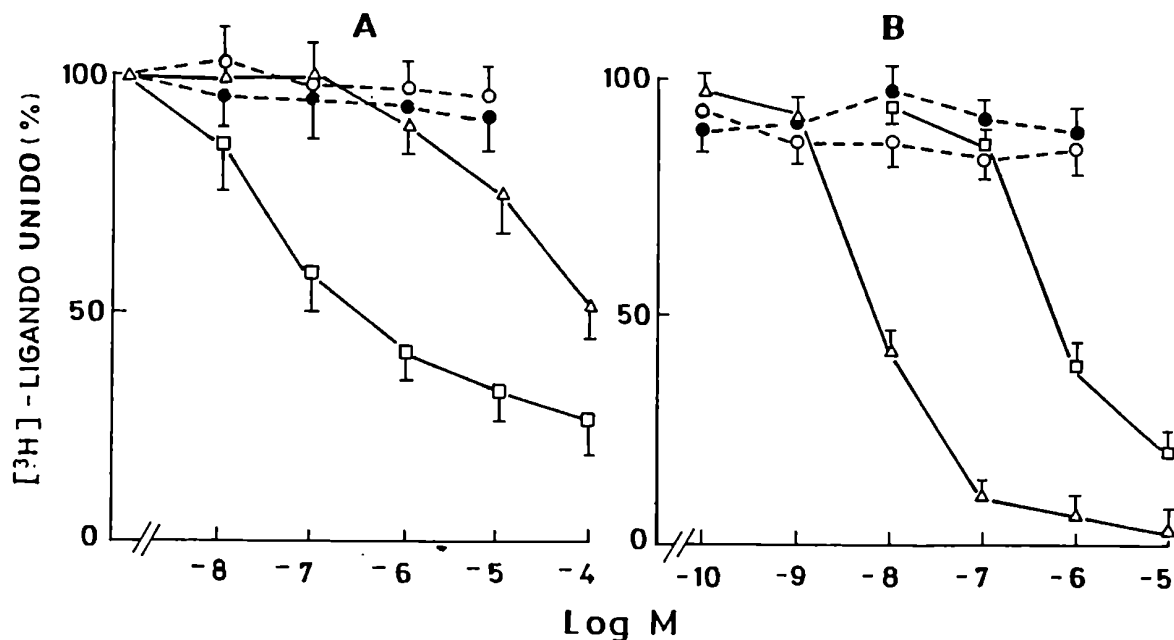


Figura 33: Especificidad de tejido del fenómeno. (A): Las membranas de linfocitos de ratón fueron incubadas con 1,1 nM de [³H]-DHA y concentraciones crecientes de IgG del grupo I (), IgG del grupo II (), isoproterenol () o propranolol (). Se representó el % de unión en cada punto con respecto al control del 100 % correspondiente a las membranas sin agregados (12,5 ± 1,5 fmol/mg prot., n=4). Estos valores son el promedio ± E.S. de cuatro experimentos. (B): Las membranas de vejiga fueron incubadas con 0,3 nM de [³H]-QNB y concentraciones crecientes de IgG de ratones inmunizados con corazón (), IgG del grupo II (), carbacol () o atropina (). Los puntos corresponden al % de unión del [³H]-QNB tomando como control (100 %) el valor de este ligando unido a las membranas sin otros agregados (31,1 ± 3,6 fmol/mg prot., n=4). Se graficaron los promedios ± E.S. de cuatro experimentos.

D I S C U S S I O N

El miocardio puede verse afectado por ciertos procesos inflamatorios, degenerativos, neoplásicos- con grados variables de significación clínica. Estas afecciones o cardiomiopatías obedecen a factores por demás diversos, lo que resulta en una gran dificultad para establecer los criterios de clasificación (183, 184). Así, desde un punto de vista práctico, parece acertado agruparlas en dos tipos fundamentales: Unas asociadas a procesos inflamatorios y otras no (185). Dentro del primer grupo se cuentan, principalmente, aquellas relacionadas con enfermedades infecciosas y las asociadas con desórdenes sistémicos. Las segundas corresponden a los trastornos del miocardio relacionados con alteraciones hormonales, metabólicas - en su mayoría hereditarias- y por agentes físicos o químicos. Según este criterio, las miocarditis virales y chagásica constituyen algunos ejemplos del primer grupo, en su carácter de procesos inmunopatológicos que comprometen al miocardio y alteran, en forma aguda o crónica, la función cardíaca.

Si bien una clasificación etiológica de las cardiomiopatías puede contribuir a su estudio, sin duda, la clave reside en comprender los mecanismos responsables de la pérdida -o disminución- de la función cardíaca. Estos, causados directamente o no por un agente etiológico, conformarían el objeto de estudio y, como tales, podrían resultar marcadores de diversas cardiomiopatías.

Ahora bien, los mecanismos de daño cardíaco son el objeto de

estudio pero cómo estudiarlos. Como siempre, existe más de una aproximación y de ellas, el desarrollo de modelos experimentales en animales de laboratorio atrae el interés, por su capacidad de tener acotadas algunas variables referentes al sexo, edad, tiempo de infección, condiciones ambientales y otras. En este contexto, los modelos de infección viral (204, 209-211, 220) y chagásica (197, 221-225) han resultado de gran valor para postular la naturaleza autoinmune de estas cardiomiopatías. En esta misma línea los modelos de miocarditis autoinmune constituyen otro punto de partida para la comprensión de los mecanismos inmunopatológicos operantes en las cardiopatías chagásica y viral (219, 226-228).

Un modelo como el de miocarditis autoinmune presenta entonces, un interés doble: Por un lado permite poner de manifiesto mecanismos inmunopatológicos y compararlos con otras cardiomiopatías y, por otra parte, ofrece la oportunidad de estudiar posibles vinculaciones entre la respuesta inmune y la actividad cardíaca.

Nuestro objetivo fue el de obtener y caracterizar el modelo que serviría luego a los fines propuestos: estudiar los mecanismos por los cuales la respuesta inmune podría intervenir en las alteraciones de la función del músculo cardíaco y comparar estas observaciones con las realizadas en otras cardiomiopatías.

La caracterización inmunológica del modelo, tanto por

inmunofluorescencia como por los estudios histológicos, indicó que es posible inducir miocarditis en estos ratones, con una frecuencia baja o nula de alteraciones espontáneas o inducidas por el adyuvante. La inmunización de un número grande de ratones, con características genéticas conocidas en lugar de animales más grandes empleados en otros trabajos (226-228), permitió realizar estudios histológicos y serológicos individuales. Una ventaja adicional de los ratones usados es la de no presentar cardiopatías espontáneas, contrariamente a lo informado en el caso de los cobayos (228, 255).

Las lesiones histológicas mostraron una gran semejanza con las descritas en el modelo de cardiopatía chagásica en ratones (222-225). La mayor parte de los ratones presentaron infiltrados linfomononucleares difusos, con una distribución homogénea en aurículas y ventrículos. No se observaron zonas de fibrosis, contrariamente a lo observado en la cardiopatía chagásica humana y en modelos murinos (186, 222, 256, 257). El aspecto de la lesión, con una gran infiltración intersticial pero sin signos de fibrosis, es característico de la miocarditis chagásica aguda y fue definido por Rosenbaum (186) como "lesión explosiva". Las alteraciones histológicas descritas en la miocarditis chagásica aguda son diferentes de las que adopta la forma crónica: En esta última se observa una forma mixta que sugiere un proceso permanentemente activo (186). Con respecto a la miocarditis

posterior a una infección por el virus Coxsackie B3, el patrón de lesión en los modelos animales consistente en una gran infiltración con zonas de necrosis, difiere del que se observa en esta miocarditis autoinmune (232, 258). Por último, no se observaron signos de miositis al estudiar los músculos esqueléticos de las patas, lo cual indica una nueva diferencia con el modelo chagásico crónico en ratones (222).

Las pruebas de inmunofluorescencia realizadas sobre cortes de miocardio o sobre miocardiocitos en cultivo demostraron la existencia de anticuerpos reactivos contra el miocardio: Esta reacción no tuvo lugar cuando los sueros habían sido previamente absorbidos con un homogenato de corazón singeneico pero, en cambio, persistió una imagen superficial si la absorción se realizaba con miosina. Estos resultados sugieren la participación de dos mecanismos, al parecer independientes, de daño de las células miocárdicas.

El anticuerpo estrechamente relacionado con miosina podría asociarse al descrito en las cardiopatías chagásica y viral (209, 210, 259, 260) aunque con características propias en cada caso. En efecto, en la cardiopatía posterior a una infección chagásica, se considera a este anticuerpo como un epifenómeno o, al menos, su rol patogénico no ha sido definitivamente confirmado (260). En cambio, en la cardiopatía vinculada a una infección por el virus Coxsackie B3, la miosina cardíaca es capaz de inducir

miocarditis en cepas de ratones susceptibles a la infección viral, con rasgos semejantes a los observados tras la entrada del virus (232). Como se verá más adelante, en el modelo de miocarditis autoinmune experimental, la reactividad contra antígenos cardíacos expresada por la fracción IgG tiene un correlato funcional y, en éste, los anticuerpos antimiosina no parecen tener ninguna participación.

El estudio funcional de los corazones con infiltrados linfomononucleares se realizó fundamentalmente "in vitro" y los resultados obtenidos se compararon con estudios de funcionalidad "in vivo", como son los electrocardiogramas realizados en ratones con miocarditis autoinmune experimental (229).

El patrón de alteraciones contractiles consistió en una disminuida tensión contráctil y trastornos del ritmo y la conducción que coinciden con el tipo de patología puesta de manifiesto en los estudios electrocardiográficos (229). Los trastornos en la conducción, resultaron semejantes a los observados en modelos chagásicos murinos (222-225). En efecto, tanto por su alta incidencia de arritmias como por las alteraciones de la onda T que corresponde a la fase de repolarización ventricular, o el alargamiento del complejo QRS que implica una falla en la conducción del estímulo a través del ventrículo, el modelo de miocarditis autoinmune experimental se asemeja al de miocarditis aguda chagásica y a las miocardiopatías

primarias virales y bacterianas (186, 259, 261-263). Difiere, en cambio, de la cardiopatía chagásica crónica o de la miocarditis aguda fatal, ya que en éstas el bloqueo de rama derecha ocurre con una frecuencia excepcionalmente alta -30 a 60%- y constituye un signo clínico distintivo de ambas (186).

En lo que respecta a los posibles mecanismos que promueven las alteraciones observadas, la aumentada producción de sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRL-A) por parte de estos corazones podría ser responsable, al menos en parte, de algunas de ellas, como la inhibición de la contractilidad y las arritmias (170, 173-175).

La liberación de cisteinil-leucotrienos es un lugar común en diversos desórdenes que comprometen al miocardio e incluyen las reacciones de hipersensibilidad y la anafilaxia (87, 172). En efecto, en el corazón se ha descrito que además del efecto depresor de la contractilidad, los leucotrienos C₄, D₄ y E₄ serían los encargados de prolongar y mantener los efectos arritmogénicos de la histamina (87). En nuestro sistema, el FPL 55712, antagonista de los receptores para la SRL-A inhibió el efecto depresor y las arritmias. La difenhidramina, por su parte, inhibió parcialmente los efectos contráctiles de la SRL-A. Se ha sugerido que, mientras el FPL 55712 tiene afinidad similar para los receptores de los leucotrienos C, D y E, la difenhidramina actúa preferentemente sobre el de leucotrieno C₄ (LTC₄) (264). Más aun, esta droga es un bloqueante de receptores H₁ de

histamina, y se ha descrito en modelos de hipersensibilidad que los leucotrienos de las series C, D y E potencian y alargan los efectos cronotrópicos y arritmogénicos de la histamina en el corazón (173, 265). De esta manera, la difenhidramina, con su efecto inhibitor parcial estaría reflejando dos fenómenos: Por un lado, la actividad de más de un tipo de cisteinil-leucotrieno en la disfunción del miocardio autoinmune, y por otro, la actividad de la histamina como gatillador de la acción de los leucotrienos que funcionaría permanentemente, al perpetuarse la interacción con el Ag por la presencia de infiltrados linfomononucleares en el tejido miocárdico.

Con respecto a la acción de los inhibidores, si bien era esperable un bloqueo de la liberación de LTC₄ por el ácido nordihidroguayarático (ANDG) o la ditizona aunque no por la indometacina (INDO), no lo era que la INDO no fuera capaz de inhibir -aunque parcialmente- el efecto depresor en la contractilidad. La presunción de que la INDO debía inhibir parcialmente el efecto se basaba en estudios de contractilidad realizados en corazones perfundidos de cobayo en un modelo de hipersensibilidad, en los cuales, luego del desafío antigénico, se podía medir LTC₄ y tromboxano B₂ (TXB₂), metabolito del tromboxano A₂, aumentados (266).

Más aun, en otros tejidos el tromboxano A₂ es liberado como resultado de la interacción del LTC₄ con sus receptores, en un efecto que comparte con la bradiquinina y la histamina, aunque

sólo es bloqueable por INDO en los dos primeros casos (267, 268). Podría ocurrir que en este caso, como ocurre con los efectos de histamina en pulmón, el efecto contráctil y la liberación de tromboxanos sean fenómenos independientes (268). Se ha visto, por otra parte, que junto con el TXA₂, el LTC₄ es capaz de promover la liberación de bajos niveles de prostaciclina (PGI₂) (268). Esta ha demostrado tener un efecto inotrópico positivo y antiarrítmico directo sobre el músculo cardíaco e indirecto a través de una vasodilatación coronaria o un efecto antiagregante plaquetario (269-272). En relación a lo apuntado antes sobre los efectos del TXA₂, se postula que sería el balance TXA₂/PGI₂ el que en última instancia reflejaría la regulación endógena de las arritmias (273). Así, en general, la regulación de la contractilidad por metabolitos del ácido araquidónico sería el resultado de la suma de efectos estimulantes y depresores de los distintos prostanoides, como se desprende de las observaciones de este y otros laboratorios (269-273).

Además, en modelos de anafilaxia cardíaca, la liberación de LTs va acompañada por un aumento en la producción de PGI₂ (87). Todas estas observaciones, tomadas en conjunto podrían justificar que el bloqueo de la ciclooxigenasa no haya tenido influencia en el efecto depresor descrito e, inclusive, haya mostrado cierta tendencia a acentuar las alteraciones en la contractilidad.

Los resultados acerca de la producción de SRL-A por los

corazones infiltrados obtenidos en el bioensayo, fueron avalados por el aumento en la liberación de LTC₄ medido por radioinmunoensayo. Ante esta evidencia uno podría inferir que sólo el LTC₄ pero no otros LTs que integran la SRL-A podrían ser los causantes de los efectos biológicos enumerados. Sin embargo, el anticuerpo empleado para su medición en este equipo comercial da un 50 % de reacción cruzada con LTD₄ que impide descartar la participación de este cisteinil-leucotrieno en el sistema.

Si bien el rol patogénico de los leucotrienos derivados de la 5-lipoxigenasa en las miocarditis no ha sido aun aclarado, en un estudio clínico reciente se comprobó una mayor eficacia de la terapia que emplea inhibidores de 5-lipoxigenasa en combinación con inhibidores de prostaglandina H (PGH), con respecto a una terapia inmunosupresora (274). La administración de inhibidores de PGH solos o de corticoides no tuvo efecto, reafirmando la responsabilidad de los leucotrienos en esas miocarditis (274).

Las pruebas destinadas a poner de manifiesto la vinculación entre infiltración linfomononuclear y alteraciones funcionales del miocardio se realizaron mediante un sistema "in vitro" de interacción.

Se pudo comprobar que las células esplénicas de ratones inmunizados en contacto con aurículas normales eran capaces de inducir una depresión de la contractilidad y, dependiendo del número, provocaban arritmias. La posibilidad de un efecto

inespecífico fue descartada porque tanto los esplenocitos de animales controles (testículo y adyuvante) como los de individuos normales tratados con concanavalina A, fueron inefectivos en la generación de fallas contráctiles cardíacas.

El mecanismo por el cual los esplenocitos ejercen ese efecto podría funcionar de dos maneras: Una, que las células mononucleares al interactuar con el miocardio auricular induzcan algún cambio metabólico y/o funcional en éste sin la participación de productos celulares solubles, o bien que esa interacción promueva la liberación de algún producto soluble por parte de las células con efecto sobre el miocardio.

A primera vista el ensayo con sobrenadantes parece confirmar la postulación de ausencia de productos solubles celulares, aunque esto merece una discusión más profunda que conviene hacerla después de contestar dos interrogantes: Uno de ellos es quiénes son las células efectoras y el otro, por qué mecanismo se modificó la contractilidad cardíaca luego del contacto célula inmune-célula cardíaca.

Vayamos a la primera cuestión. La identificación de la población T como responsable del efecto depresor imponía una segunda prueba: Conocer qué subpoblación estaba implicada. Así, la eliminación de subpoblaciones con anticuerpos monoclonales y complemento, dio como resultado que el grupo enriquecido en células T con marcador L3T4 era capaz de inhibir la contractilidad. Además, si bien la presencia de macrófagos de

ratones inmunizados no modificaba los efectos, su agregado junto con las células T inmunes hacia a estas mas eficaces.

Con respecto a la segunda pregunta acerca de cuáles son los mediadores de la depresión de la contractilidad posterior a la acción de los linfocitos T, los ensayos realizados en corazones infiltrados habían indicado un compromiso de la SRL-A en los efectos. Ahora cabía preguntarse si en este sistema de interacción "in vitro" también ocurría así y, en este caso, quién era la fuente de los leucotrienos. Las pruebas coincidieron en señalar a la SRL-A como principal metabolito activo. A su vez, una caracterización con inhibidores de lipoxigenasa en las células o en el miocardio indicó que los leucotrienos eran liberados por este último.

Ahora bien, una vez identificadas las células T L3T4⁺ y la SRL-A de producción cardíaca como las dos puntas del mecanismo, valdría la pena plantear la posible serie de fenómenos intermedios y reformularse si es válido aceptar que no intervienen factores solubles provenientes de los linfocitos. Un mecanismo clásico por el cual las células T L3T4⁺ participan en reacciones de hipersensibilidad retardada y promueven fenómenos autoinmunes es a través de la producción de linfoquinas y depende de la presentación del antígeno (Ag) en el contexto de los Ags de clase II por parte de las células accesorias (275-277). Con respecto a estas últimas se ha observado que, así como los macrófagos, también otras células son capaces de presentar Ags en

el contexto de clase II: En efecto, las células dendríticas, de Langerhans y las endoteliales cumplen funciones de células presentadoras (278, 279). Por otra parte se ha comprobado que el interferón γ y el factor de necrosis tumoral pueden inducir la expresión de Ags de clase II en células que normalmente no los expresan (37, 38, 279). Esto cobra especial importancia en ciertas enfermedades autoinmunes: En estos desórdenes, la expresión aberrante de Ags de clase II en las células blanco de la respuesta autoinmune las convierte en eficaces presentadoras de sus propios Ags, aportando una estimulación adicional y perpetuando la respuesta (36, 280-282).

En relación al modelo de miocarditis autoinmune experimental y en vista de las evidencias señaladas antes parece acertado pensar que las células efectoras sean las T L3T4⁺ favorecidas por una expresión "in situ" de Ags de clase II en el corazón infiltrado. Esto estaría avalado por las observaciones realizadas en otras enfermedades autoinmunes y modelos experimentales acerca de un alto porcentaje de células T L3T4⁺ en el infiltrado y una alta responsabilidad en los ensayos de transferencia (39, 280, 283). Por otro lado, si pensamos en los resultados de la interacción "in vitro" de los linfocitos con el miocardio auricular, en que la expresión de Ags de clase II ya no estaría aumentada al tratarse de corazones normales, la presentación de Ags cardíacos podría recaer en las células endoteliales del corazón, hipótesis avanzada por Burnet (284) para justificar la

respuesta celular en la autoinmunidad órgano-específica y que tiene más vigor a la luz del conocimiento actual sobre presentación de Ags. Apoyan esta formulación las primeras observaciones de Mc Farland (285), revisadas más tarde (286, 287), en cuanto a la "adhesión" de linfocitos a células del endotelio vascular de ciertos órganos afectados por una respuesta inmune. Como evidencia indirecta, la capacidad de los macrófagos de potenciar la respuesta está en coincidencia con un mecanismo típico de células $L3T4^+$ y concuerda con estudios de proliferación de células autorreactivas "in vitro" (283).

Con respecto a la liberación de factores solubles por las células T $L3T4^+$, si bien no detectables en los sobrenadantes por el ensayo biológico con la aurícula, sería arriesgado descartarla "a priori": Quizás estos factores logren una concentración efectiva en la proximidad de la célula cardíaca blanco de la actividad inmune que se pierde por dilución del sobrenadante en el baño de órgano. Se impone en estudios futuros, en primer lugar, la concentración de estos factores en los sobrenadantes y en segundo lugar y más importante, su identificación.

La postulación de un efecto de las células linfoideas sobre la actividad contráctil del miocardio se menciona cada vez más como un posible factor patogénico: Si bien hasta ahora se pensaba que la sola presencia de infiltrados que promovían lesiones tisulares era la causa de la disfunción, hay una tendencia a investigar qué factores celulares podrían intervenir en esa

interacción. Tales estudios apuntan a conocer más a fondo la actividad de esos productos sobre diversas rutas metabólicas, mensajeros intracelulares y otras señales en la función del miocardio (185, 288, 289). A estos trabajos se suman otros que documentan la acción directa de ciertas linfoquinas sobre la función contractil del miocardio (49, 290, 291).

Así, el modelo de miocarditis experimental coincide en algunos aspectos con otras miocardiopatías en cuanto a la actividad inmune celular. Por ejemplo se ha sugerido que el rol patogénico descansaría en las células T L3T4⁺ en la miocardiopatía chagásica (292) mientras que en la cardiomiopatía post-viral, junto con las células T de hipersensibilidad retardada y citotóxicas, también la población de células NK estaría involucrada (208, 213, 293, 294).

El interés por conocer el posible rol de la respuesta inmune humoral en la miocarditis autoinmune tomó cuerpo a partir de un razonamiento semejante al desarrollado alrededor de la hipótesis de participación de las células inmunes en la actividad del miocardio. Mientras el punto de partida en el caso de la inmunidad celular era la presencia de infiltrados linfomononucleares en el miocardio autoinmune, la propuesta de ensayar los sueros obedeció a dos observaciones: Por un lado la presencia de anticuerpos de tipo IgG fijados en los cortes de miocardio autoinmune revelados por inmunofluorescencia indirecta

(comunicación personal del Dr. P. Cossio). Por otro, las comunicaciones que documentan la existencia de anticuerpos circulantes con capacidad para alterar la actividad contráctil del miocardio en la miocardiopatía chagásica (193, 194) y recientemente también en la inducida por el virus Coxsackie B3 (295).

El sistema experimental permitió evaluar la actividad contráctil de aurículas aisladas y la respuesta fisiológica ante el estímulo con neurotransmisores que normalmente regulan su función. Sin embargo, los efectos en la contractilidad constituyen una respuesta relativamente distante de los propios receptores y, como tal, involucra o depende de una serie de mecanismos que incluyen proteínas transductoras, mensajeros intracelulares, activación de distintas vías metabólicas, fosforilación de canales iónicos y proteínas en general.

La organización del trabajo experimental con anticuerpos fue entonces la siguiente: en primer lugar, conocer cuál era -si lo tenían- el comportamiento de los sueros en la contractilidad de aurículas aisladas normales, luego purificar la fracción sérica responsable, e identificar los sistemas de receptores cardíacos involucrados y, finalmente, con esta información farmacológica, la confirmación por medio de pruebas bioquímicas: mensajeros intracelulares y unión específica a receptores. Por último se efectuaron algunas pruebas para evaluar la especificidad

inmunológica del fenómeno.

Los sueros de los ratones -estudiados individualmente- mostraron un comportamiento semejante e inhibitorio de la actividad cardíaca dependiente de la concentración. Este fue el primer indicio de actividad biológica y se imponía un fraccionamiento del suero para identificar a los efectores. Así, la separación de inmunoglobulinas primero y de IgG luego, dio como resultado que esta última era la responsable de los efectos en la actividad contráctil cardíaca.

En cuanto al efecto de la IgG autoinmune sobre los agonistas exógenos carbacol y acetilcolina, éste fue la inhibición del efecto de los agonistas, comportamiento que recuerda al de los agonistas parciales (296, 297).

La hipótesis de la existencia de anticuerpos capaces de interactuar con receptores hormonales o de neurotransmisores fue avanzada por Kriss y col. (298) en 1964 trabajando con sueros de pacientes hipertiroideos con enfermedad de Graves, a partir de los estudios pioneros sobre el LATS (estimulante tiroideo de acción prolongada) de Adams en 1958 (299). Sin embargo, recién en 1974 Manley y col. (300) demostraron la capacidad del LATS agonista- de competir con la tirotrófina por el receptor de esta última en la tiroides. A continuación, Flier y col. (62) en 1975 y Lindstrom y col. (40) en 1976 documentaron la presencia de anticuerpos dirigidos contra los receptores de insulina, los

primeros, y de acetilcolina los segundos, en dos enfermedades autoinmunes como la diabetes insulino-resistente tipo B y la miastenia gravis. En 1980, C. Venter y col. (64) demostraron la presencia de autoanticuerpos contra el receptor beta adrenérgico de pulmón en sueros de pacientes con rinitis alérgica e individuos asmáticos. Sin embargo, la ocurrencia de anticuerpos séricos con actividad beta adrenérgica ya había sido sugerida en 1976 por Sterin-Borda y col. (301) trabajando con sueros de pacientes chagásicos sobre el miocardio auricular y confirmadas más tarde mediante estudios sobre receptores y mecanismos de transducción (193, 194). Recientemente, en 1989, se informó de la existencia de este tipo de anticuerpos en otra cardiomiopatía, la cardiopatía dilatada idiopática (295).

El descubrimiento de anticuerpos anti-receptor en distintas enfermedades, con capacidad para bloquear o mimetizar la acción de los agonistas endógenos en los órganos afectados, abre una nueva perspectiva en el estudio de la patogenia de esos desórdenes. Pero además, la posibilidad de disponer de anticuerpos anti-receptor condujo a importantes descubrimientos sobre la estructura molecular de tales receptores: En efecto, las primeras herramientas en estos estudios fueron los autoanticuerpos aislados a partir de sueros humanos que, posteriormente, cedieron su lugar a anticuerpos obtenidos por inmunización con receptores purificados. En la actualidad, la tendencia es al uso de anticuerpos monoclonales para estos fines

ya que, por su homogeneidad, permiten estudiar la homología del receptor a nivel de determinantes antigénicos únicos y determinar su estructura final (302, 303).

Volviendo a la miocarditis autoinmune, los primeros experimentos sugerían la posibilidad de una IgG con actividad sobre receptores de neurotransmisores cardíacos, pero eran necesarias más evidencias que confirmaran estos indicios, y para ello, vale la pena hacer una breve revisión de los mecanismos gatillados por estos receptores.

Tanto los receptores beta adrenérgicos como los colinérgicos muscarínicos pertenecen a una familia de receptores con gran homología estructural y todos coinciden en la capacidad de transformar los estímulos externos en señales intracelulares, a través de sistemas transduccionales que involucran a proteínas regulatorias dependientes de nucleótidos de guanina o proteínas G (118). La estimulación de los receptores beta adrenérgicos así, cataliza la unión de GTP a la subunidad α_s de la proteína G que, ya en su conformación activa, a su vez promueve la activación de los efectores acoplados a ella: Hasta el presente se conocen la adenilato ciclase (106) y muy recientemente se ha descrito un canal de calcio en el corazón (304). En tanto, la unión de los agonistas colinérgicos muscarínicos a su receptor, por un mecanismo semejante al descrito antes, aumentan la velocidad de recambio de GDP por GTP de la subunidad α de

diversas proteínas G: Estas proteínas, a las que genéricamente se las agrupa por ser sustrato de la toxina pertussis, no han sido diferenciadas funcionalmente con total claridad aun, e incluyen las llamadas G_i , G_p y G_k (112). Las mismas están vinculadas en el corazón con efectos tales como la inhibición de adenilato ciclasa, la apertura de canales de potasio y la activación de fosfolipasas (137, 138, 140, 142).

Además de la inhibición de la producción de AMPc y el aumento de la corriente de potasio y del ciclo de fosfoinosítidos, todos efectos que involucran a proteínas G en el corazón, la estimulación muscarínica induce un aumento de la producción de GMPc por guanilato ciclasa (141). En este contexto, la disminución de la actividad contráctil que producen los agonistas colinérgicos muscarínicos parece deberse a una suma de efectos: Mientras el aumento de la permeabilidad al potasio es directo y no requiere segundos mensajeros (139), la disminución de la corriente lenta de calcio podría responder a una combinación de niveles altos de GMPc y bajos de AMPc (146, 151).

La siguiente evidencia, entonces, de un efecto sobre los receptores por parte de la IgG autoinmune estuvo dada por los resultados obtenidos con esta sobre los niveles de nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc. Aquí, la IgG aparecía con un compromiso doble, beta adrenérgico y colinérgico muscarínico, ya que su capacidad para inhibir el aumento de AMPc inducido por

isoproterenol no era bloqueable en más de un 40 % por atropina.

Por otra parte la acción de la IgG autoinmune sobre la actividad del carbacol resultó en una inhibición del efecto de este último tanto en el aumento de GMPc como en la disminución de AMPc. Estos datos concuerdan con los primeros experimentos de contractilidad auricular, tanto en la especificidad farmacológica del fenómeno como en el comportamiento de la IgG semejante al de los agonistas parciales.

Los niveles de nucleótidos cíclicos pueden dar una pauta de la actividad de los receptores, pero no concluyente, ya que lo que se mide es justamente niveles y no producción, y éstos también están sujetos a variaciones en la velocidad de degradación (305). Por lo tanto realizamos algunos experimentos preliminares para medir la actividad de adenilato ciclasa en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Bs. As. Vale la pena comentar los resultados -por su carácter de preliminares no fueron incluidos en el capítulo de resultados- ya que tienden a confirmar una inhibición por la IgG autoinmune de la actividad de la enzima en membranas sarcolemas de cobayo, semejante a la producida por el carbacol.

Los ensayos funcionales referidos antes abrían un nuevo interrogante: Además de inducir, en el reconocimiento de antígenos cardíacos, efectos biológicos que involucran a

receptores de membrana, la IgG autoinmune, ¿es capaz de interactuar directamente con estos receptores en una fracción enriquecida como la fracción microsomal?. Si era así, valía la pena estudiar las condiciones de la interacción y las conclusiones que de ellas se desprenden a la luz de los resultados obtenidos con otros anticuerpos y autoanticuerpos anti-receptor.

Los ensayos de unión específica con [³H]-QNB y [³H]-DHA en membranas microsomales para identificar a los receptores se llevaron a cabo según las técnicas descriptas antes, pero fue necesario caracterizar las condiciones de incubación con las IgG inmune y controles. Recientemente se propuso la inclusión de inhibidores de proteasas en este paso (295) pero, en los tiempos empleados por nosotros no parece imprescindible ya que no registramos cambios significativos en el número y afinidad de los receptores. De todos modos, en todos los ensayos incluimos un control de membranas solas sin incubar previo al ensayo con los ligandos radioactivos, además de su homóloga incubada. Conocidas las condiciones de equilibrio y de incubación con IgG, realizamos las curvas de desplazamiento y, en ambos casos, la IgG autoinmune actuó en forma dependiente de la concentración. La actividad máxima inhibitoria se verificó con 10^{-7} M de IgG en ambos sistemas, suponiendo un PM de 150.000.

Tanto las diluciones séricas que indujeron la mitad del efecto máximo sobre la contractilidad -aproximadamente 1:300-

como la concentración media efectiva de IgG -alrededor de 10 µg/ml- son comparables con las encontradas para anticuerpos contra el receptor de insulina en el síndrome de diabetes insulino-resistente tipo B (62), contra el de acetilcolina en la miastenia gravis (306) y contra el receptor beta adrenérgico en pacientes chagásicos (193), con cardiopatía post-viral (295), asmáticos (63) y en un modelo murino de aloinmunización (307). Estos títulos, por lo general, están un orden o más por debajo de los obtenidos por inmunización con receptores purificados (308-311).

Puede parecer obvio que la IgG autoinmune, por inducir efectos mediados por receptores, tenga la capacidad de inhibir la unión específica de ligandos radioactivos. Sin embargo, esto no es necesariamente así para todos los anticuerpos descritos: Por ejemplo, Couraud y col. (308) obtuvieron anticuerpos anti-receptor beta adrenérgico a partir de receptores de eritrocitos de pavo, que eran capaces de estimular la actividad de adenilato ciclasa pero no modificaban la unión del [³H]-DHA. Del mismo modo, anticuerpos provenientes de conejos inmunizados con eritrocitos de rana con receptores β₂ adrenérgicos, no inhibieron la unión del iodo-cianopindolol ([¹²⁵I]-CYP) aunque probaron un efecto inhibitorio de la actividad de adenilato ciclasa estimulada por isoproterenol (309). La explicación de los autores es que la unión de los anticuerpos al receptor se

produciría en sitios distintos al de unión de los ligandos, pero la interacción conservaría la capacidad de modificar el acople con los efectores. Existen otros ejemplos, fuera del receptor beta adrenérgico, de anticuerpos con actividad sobre receptores que no inhiben la unión del ligando específico, como los obtenidos por inmunización con receptores de insulina (312), de acetilcolina (313) o de estradiol (314). También es importante tener presente que, de todos los anticuerpos que se producen contra una sola molécula -receptor o enzima- se unen y hasta pueden inmunoprecipitarlo, sólo algunos resultan con actividad biológica: Ejemplos de ello son los anticuerpos contra lisozima (315), contra el receptor beta adrenérgico (311), de acetilcolina (316, 317).

Con respecto a la inhibición, las curvas de saturación en presencia de una concentración fija de la IgG autoinmune y el posterior análisis de Scatchard, permitieron calcular los valores de K_D y B_{max} . La primera reflexión, si uno se atiene estrictamente al resultado y basado en los conocimientos de cinética de la interacción receptor-ligando, sería que la IgG se comporta como un inhibidor no-competitivo de los receptores beta adrenérgico y colinérgico muscarínico. Pero hay otra reflexión posible que parte de diferenciar la interacción receptor-ligando de la antígeno-anticuerpo.

La afinidad de una unión de esta naturaleza se puede considerar como la sumatoria de fuerzas no-covalentes que

resultan de la interacción entre uno y otro en condiciones de equilibrio. En el caso de la unión antígeno-anticuerpo, la afinidad es una expresión termodinámica de la interacción primaria entre un determinante antigénico y un único sitio de combinación en el anticuerpo. En la práctica, el término afinidad se suele aplicar a las reacciones hapteno-anticuerpo monovalentes y, en cambio, se prefiere "avidez" o "afinidad funcional" para las uniones donde hay contribución de factores adicionales tales como valencia de anticuerpos, de antígenos, y otros factores asociados no involucrados directamente en la interacción primaria (318, 319). El cálculo de la afinidad de esta unión, tanto por estudios termodinámicos, que emplean un análisis semejante al descrito para la unión ligando-receptor, como por aquellos en los que se miden las constantes cinéticas de asociación y disociación, han puesto en evidencia una gran heterogeneidad en la afinidad: La razón de este fenómeno se desprende de las consideraciones anteriores acerca de la complejidad de la interacción entre antígenos y anticuerpos polivalentes que, además, resulta en la formación de agregados y complejos a velocidades que no necesariamente dependen de la interacción primaria (319, 320). En los estudios cinéticos, la heterogeneidad de poblaciones de sitios de unión en los anticuerpos se ha exhibido menos claramente que en los termodinámicos y parece tener más lugar en la reacción de disociación que en la de asociación (321, 322). En coincidencia, otros autores demostraron

que la estabilidad del complejo antígeno-anticuerpo está gobernada por la constante de velocidad de disociación, la cual, en última instancia, es la que determina la afinidad de la unión (321, 325).

Consideraciones como las expuestas en el párrafo anterior llevan a cuestionar la validez de una asimilación total entre las características de unión de los pares antígeno-anticuerpo y receptor-ligando. En este contexto, parece más apropiado pensar en factores como la bivalencia de los anticuerpos o las diferencias en las velocidades de disociación del complejo antígeno-anticuerpo en relación al ligando monovalente-receptor, y atribuir a esos factores ciertos comportamientos como, en este caso, la unión no-competitiva de los anticuerpos a los receptores. Esta reflexión además, se apoya en la evidencia que una gran cantidad de los anticuerpos anti-receptor descriptos presentan una inhibición del número máximo de sitios sin cambiar la afinidad (62, 193, 295, 310, 326), con la excepción del LATS (300), de anticuerpos con actividad beta adrenérgica dirigidos contra antígenos de clase I (327), anticuerpos contra el receptor beta de eritrocitos de pavo (328) y anticuerpos monoclonales contra ese receptor (326). En el caso de los anticuerpos contra el receptor beta relacionados con antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (327), los autores proponen que la microagregación de receptores inducida por el aloanticuerpo sería

responsable del tipo de comportamiento (329). En cuanto al trabajo sobre eritrocitos de pavo (328), las diferencias que se obtienen con respecto a Schreiber y col. (310) en el mismo sistema, se justifican a partir del método de purificación de los anticuerpos que, en su caso, dejaría otros anticuerpos contaminantes. La situación de los anticuerpos monoclonales parece más sencilla de explicar por las características monovalentes de la interacción (302).

Valdría la pena comentar en vista de los trabajos citados que, hasta el momento, la capacidad de inducir una respuesta funcional no parece estar en relación estricta con el tipo de comportamiento de los anticuerpos como inhibidores en presencia de ligandos específicos y, por lo tanto, conviene tomar estos datos sólo como rasgos particulares de la interacción de cada uno.

Por último, en vista de las consideraciones previas, resulta oportuno revisar el "agonismo parcial" de la IgG autoinmune que se sugirió a partir de los estudios de funcionalidad. Tales conceptos dan lugar a dos análisis posibles: Según el primero de éstos -basado en una asimilación estricta de la interacción antígeno-anticuerpo y receptor-ligando- el comportamiento de la IgG autoinmune indicaría una dificultad de la misma para promover un cambio de estado en el receptor, sensible a GTP. Este mecanismo, postulado para la pilocarpina como agonista parcial,

se ha comprobado mediante pruebas funcionales en las células de la línea 1321 N1 de astrocitoma humano (330) y por estudios de unión de ligandos radioactivos en aurícula de rata con pilocarpina y otros ligandos colinérgicos muscarínicos (161, 254, 331).

El punto de partida para el otro análisis válido es no generalizar hasta tal punto las características del sistema receptor-ligando a la interacción de los anticuerpos, y prever que las diferencias en el comportamiento de un anticuerpo velocidades de asociación y disociación, valencia, etc.- con respecto a un ligando simple, pueden ser la clave para explicar estos resultados.

Las pruebas realizadas para conocer la especificidad inmunológica del fenómeno fueron de dos tipos: Especificidad de especie y de tejido.

La primera fue evaluada mediante ensayos de inhibición de la unión de los ligandos específicos [^3H]-DHA y [^3H]-QNB por la IgG, a membranas de aurícula de rata y cobayo e indicaron un efecto semejante al observado en ratones. Esto resultados se asemejan a los descriptos para autoanticuerpos en dos cardiomiopatías en que se ensayaron sueros humanos sobre aurículas de rata y cobayo (193, 194, 295), o aquellos presentes en sueros de pacientes asmáticos probados en pulmón de perro (64), o el caso del LATS que se ensayó en tiroides porcina (299).

La especificidad de tejido se realizó junto con una caracterización del efecto de un agonista y un antagonista y la elección de los mismos se basó en la población de receptores característica de cada tejido. En el caso del sistema beta adrenérgico, la falta de efecto sobre linfocitos podría deberse a que éstos, en contraste con el corazón, tienen una población homogénea de receptores β_2 (249). Esto originó los estudios en membranas de adipocitos que expresan mayoritariamente β_1 (251). La imposibilidad de hallar un tejido M_2 , ya en el terreno del receptor colinérgico muscarínico, de conocida exclusividad de distribución en corazón (132), hizo necesario el uso de membranas de vejiga que expresan receptores M_3 (131), algo más cercanos a los M_2 que los M_1 que se distribuyen en el sistema nervioso fundamentalmente (131). Del análisis de las curvas se desprende la conclusión de que existe especificidad de tejido, tanto en la inmunización como en el efecto descripto.

Estos últimos resultados no concuerdan con los obtenidos con sueros de pacientes chagásicos en que existirían dos especificidades, anticuerpos que reaccionan con el receptor β_1 del miocardio y con el β_2 de esplenocitos (332). En otros sistemas también se ha observado especificidad de tejido para los autoanticuerpos pero no en todos se han elegido células con receptores del mismo subtipo (64, 295).

Los resultados expuestos hasta aquí hablan de la existencia

de anticuerpos con actividad sobre receptores en el miocardio, con todas las consecuencias previsibles en la actividad cardíaca.

Sin embargo, en la introducción de esta última parte de respuesta inmune humoral, mencionamos que uno de los motivos por los que nos interesaba saber si existían anticuerpos activos era por la presencia de anticuerpos de tipo IgG unidos a las membranas de corazones autoinmunes y revelados por inmunofluorescencia. Queda por saber si hay relación entre esos anticuerpos y los que tienen actividad beta adrenérgica o colinérgica muscarínica presentes en el suero, así como la cinética de aparición que podría aportar datos sobre su condición patogénica. En este sentido, no ha sido aun aclarado el rol de diversos autoanticuerpos en el desarrollo de los síntomas y signos clínicos que caracterizan a cada desórden: Mientras en sujetos asmáticos no hay opiniones coincidentes en cuanto a correlación entre severidad y aparición de anticuerpos (333-335), ésta sí se ha encontrado en la diabetes tipo B, en la miastenia gravis y en la enfermedad de Graves (336, 40, 337). En el caso de las cardiomiopatías, su descubrimiento fue reciente y la incidencia así como el rol patogénico no han sido documentados.

CONCLUSIONS

Los resultados expuestos en este trabajo constituyen una evidencia acerca de la influencia de diversos efectores de la respuesta inmune sobre la actividad del miocardio.

En los corazones de los animales inmunizados con corazón pudieron observarse dos fenómenos simultáneos: La presencia de infiltrados linfomononucleares de grados variables y, a la vez, la aparición de una serie de alteraciones contráctiles que incluyeron disminución de la tensión, taquicardia y arritmias. Estas primeras observaciones, insuficientes para establecer una relación entre ambos fenómenos, precedieron a otros experimentos: En estos se comprobó que las células T reactivas provenientes de animales inmunizados fueron capaces de inducir arritmias y depresión de la contractilidad de aurículas normales: Esta observación apoyaría la hipótesis de participación de las células infiltradas en el desarrollo de las manifestaciones funcionales. Mas aun, la presencia de linfocitos T promueve un aumento del metabolismo del ácido araquidónico por la vía 5-lipoxigenasa, con la producción de sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRL-A) en corazones normales, la cual contribuiría, al menos en parte, a la aparición de los desórdenes descritos.. De hecho, un mecanismo similar se mostró como responsable de las alteraciones contráctiles en los corazones infiltrados.

En cuanto a la inmunidad humoral, la fracción IgG de los sueros de animales inmunizados fue capaz de alterar la función cardíaca por diferentes mecanismos: La inhibición de la

contractilidad podría resultar de una suma de efectos que se pondrían en marcha por la interacción de la IgG autoinmune con los receptores colinérgicos muscarínicos y beta adrenérgicos de las células cardíacas. Las variaciones en los niveles de nucleótidos cíclicos -GMPc y AMPc-, como manifestaciones secundarias de esta interacción, podrían estar involucradas en la disminución de la tensión del miocardio autoinmune a través, por ejemplo, de la regulación de la corriente lenta de calcio, así como por otros mecanismos descritos en este tejido.

Además, la interacción de la IgG con los receptores mencionados queda demostrada por los ensayos de unión de ligandos específicos para aquéllos y de estos resultados se puede concluir que depende de la concentración y es de tipo no competitivo. Se puede describir, entonces, a la IgG autoinmune como una IgG "tipo agonista" colinérgico muscarínico, con un comportamiento semejante -en términos eminentemente farmacológicos- al de un agonista parcial.

En fin, las alteraciones contráctiles observadas en el miocardio autoinmune podrían deberse -en principio- a dos efectores de la respuesta inmune: Los linfocitos T y los anticuerpos IgG, los cuales, luego de interactuar en forma específica con estructuras de membrana de las células cardíacas, modificarían diversos parámetros de su actividad.

El estudio de los mecanismos de regulación por el sistema inmune de otros sistemas del organismo ha enfocado, sobre todo,

la influencia de los efectores del primero sobre funciones nerviosas y endócrinas. Sin embargo, esta actividad no parece limitada sólo a ellos, como surge de los datos comunicados recientemente en dos cardiomiopatías, la enfermedad de Chagas y la cardiopatía dilatada posterior a una infección viral.

En este contexto, los fenómenos observados en la miocarditis autoinmune experimental parecen formar parte de una variedad de desórdenes y su análisis podría constituir un aporte para el estudio clínico y perspectivas de tratamiento.

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

1. Tonegawa S. (1981). Nature 302: 575-581.
2. Kronenberg M., Siu G., Hood L. E., Shastri N. (1986). Ann. Rev. Immunol. 4: 529-591.
3. Nossal G.J.V., Lederberg J. (1958). Nature 181: 1419-1420.
4. Nossal G.J.V. (1987). Progress in Immunology VI. Editado por Cinader B., Miller R.G. Nueva York. Academic Press.
5. Janeway C. A., Bottomly K., Horowitz J., Kaye J., Jones B., Tite J. (1985). J. Immunol. 135: 739 S-745 S.
6. Eisen H. N. (1981). Immunology. Editado por Harper y Row. Filadelfia. pp: 381-418.
7. Malkovsky M., Sondel P. M., Strober W., Dalglish A. G. (1988). Clin. exp. Immunol. 74: 151-161.
8. Lanzavecchia A. (1985). Nature 314: 537-539.
9. Nossal G. J. V. (1987). J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 94: 802-811.
10. Schwartz R. H., Paul W. E. (1976). J. Exp. Med. 143: 529-540.
11. Cantor H., Gershon R. K. (1979). Fed. Proc. 38: 2058-2064.
12. Blazsek I., Mathé G. (1983). Biomedicine and Pharmacotherapy 37: 258-265.
13. Margni R. A. (1988). Ciencia e Investigación 42 332-339.
14. Salomon D. R., Cohen D. J., Carpenter C. B., Milford E. L. (1983). J. Immunol. 131: 1065-1072.

15. Crosier P. S., Broom B. C. (1981). *Immunology* 43: 19-24.
16. Bottomly K., Kaye J., Jones B., Jones F., Janeway C. A. (1983). *J. Mol. Cell. Immunol.* 1: 42.
17. Hodes R. J., Germain R. N., Bluestone J. A. (1984). *Immunology Today* 5: 279-281.
18. Jerne N. K. (1974). *Ann. Immunol.* 125: 373-389.
19. Moller G. (1977). *Immunol. Rev.* 34: 1-164.
20. Geha R. S. (1982). *J. Immunol.* 129: 139-144.
21. Nossal G. J. V. (1983). *Ann. Rev. Immunol.* 1: 33-62.
22. Glazier A., Tutschka P. J., Farmer E. R., Santos G. W. (1984). *J. Exp. Med.* 158: 1-8.
23. Kong Y. M., Ojaysu I., Giraldo A. A., Beisel K. W., Sundick R. S., Rose N. R., David C. S., Audibert F., Chedid L. (1982). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 392: 191-209.
24. Rose N. R., Kong Y. M., Okayasu I., Giraldo A. A., Beisel K. Sundick R. S. (1981). *Immunological Rev.* 55: 229-314.
25. Zanetti M. (1985). *Immunology Today* 6: 299-302.
26. Zanetti M., Glotz D., Rogers J. (1986). *J. Immunol.* 137: 3140-3146.
27. Zanetti M., Rogers J., Katz D. H. (1988). *Autoimmunity* 1: 23-26.
28. Benacerraf B. (1978). *J. Immunol.* 120: 1809-1812.

29. Babbitt B. P., Allen P. M., Matsueda G., Haber E., Unanue E.R. (1985). *Nature* 317: 359-361.
30. Winchester G., Sunshine G. H., Nardi N., Mitchison N. A. (1984). *Immunogenetics* 19: 487-492.
31. Bikoff E. K., Yu H., Eckhardt L. A. (1988). *Eur. J. Immunol.* 18: 341-348.
32. Lorenz R. G., Allen P. M. (1988). *Immunological Rev* 106: 115-127.
33. Roitt I., Brostoff J., Male D. (1986). *Inmunologia*. Editado por Gower Medical Publishing Ltd., Barcelona. pp: 23.1-23.11.
34. Grabar P. (1983). *Immunology Today* 4: 337-340.
35. Burnet F. M. (1970). *Lancet* ii: 358-360.
36. Chaplin D. D., Kemp M. E. (1988). *The Year in Immunology* 3: 179-198.
37. Pujol-Borrel R., Todd I., Doshi M., Bottazzo G. F., Feldmann M. (1987). *Nature* 326: 304-306.
38. Londei M., Lamb J. R., Bottazzo G. F., Feldmann M. (1984). *Nature* 312: 639-641.
39. Kong Y. M., Bagnasco M., Canonica G. W. (1986). *Immunology Today* 7: 337-339.
40. Lindstrom J. M., Seybold M. E., Lennon V. A., Whittingham S., Duane D. (1976). *Neurology* 26: 1054-1060.
41. Hang L., Aguado M., Dixon F., Theofilopoulos A. (1985). *J. Exp. Med.* 161: 423-428.

42. Burnet M. F. (1972). Autoimmunity and autoimmune disease. Editado por Med. Technical Publishing, Lancaster. pp: 153-171.
43. Cochrane C. G., Kofler D. (1973). Adv. in Immunol. 16: 185-264.
44. Weigle W. O. (1980). Adv. in Immunol. 30: 159-273.
45. Nishizuka Y. (1982). Acta Pathol. Jpn. 32 (Supl. 1): 211-222.
46. Besedovsky H. O., Sorkin E. (1977). Clin. exp. Immunol. 27: 1-12.
47. Besedovsky H. O., Rey A., Sorkin E. (1985). J. Immunol 135: 750 S- 754 S.
48. Blalock J. E. (1984). J. Immunol. 132: 1067-1070.
49. Blalock J. E., Stanton J. D. (1980). Nature 283: 406-408.
50. Oppenheim J. J., Gery I. (1982). Immunology Today 3: 113-119.
51. O'Dorisio M. S., Wood C. L. O'Dorisio T. H. (1985). J. Immunol. 135: 792 S-796 S.
52. Weigent D. A., Blalock J. E. (1987). Immunological Rev. 100: 79-108.
53. Hall N. R., Spangelo B. L., Farah J. M., O'Donohue T. L., Goldstein A. L. (1986). Leukocytes and Host Defense. Editado por A. R. Liss, Inc. pp: 187-196.
54. Dunn A. J. (1988). J. Receptor Res. 8: 589-607.

55. Felten D. L., Felten S. Y., Carlson S. L., Ulschowka J. A., Livnat S. (1985). *J. Immunol.* 135: 755 S-765 S.
56. Johnson K. W., Davis B. H., Smith K. A. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 6072-6076.
57. Sanders V. M., Munson A.E. (1985). *Pharmacol. Rev.* 37: 229-248.
58. Payan D. G., Levine J. D. Goetzl E. J. (1984). *J. Immunol* 132: 1601-1604.
59. Goetzl E. J., Chernov T., Renold F., Payan D. G. (1985). *J. Immunol.* 135: 802 S-805 S.
60. Monjan A. A. (1981). *Psychoneuroimmunology*. Editado por Ader R., Academic Press, Nueva York. pp: 185-228.
61. Strosberg A. D. (1984). *Idiotypy in Biology and Medicine*. Editado por Kohler H., Urbain J., Cazenave P.A. Academic Press, Nueva York. pp 365.
62. Flier J. S., Kahn C. R., Roth R., Bar R. S. (1975). *Science* 190: 63-65.
63. Fraser C. M., Venter J. C., Kaliner M. (1981). *N. England J. Med.* 305: 1165-1170.
64. Venter J. C. Fraser C. M. (1980). *Science* 207: 1361-1362.
65. Hall R., Smith B. R., Mukhtar E. D. (1975). *Clin. Endocrinol.* 4: 213-230.
66. De Coursey T. E., Chandy K. G., Gupta S., Cahalan M. D. (1984). *Nature* 307: 465-468.
67. Blalock J. E., Harbour-Mc Menamin D., Smith E. M. (1985). *J.*

- Immunol. 135: 858 S-861 S.
68. Katz A. M. (1977). Physiology of the heart. Editado por Raven Press, Nueva York. pp: 1-24.
 69. Huxley H. E. (1969). Science 164: 1356-1366.
 70. Squire J. M. (1983). Trends in Neuroscience 6 409-413.
 71. Levy M. N., Martin P. J., Stuesse S. L. (1981). Ann. Rev. Physiol. 43: 443-453.
 72. Levy M. N., Martin P. J. (1979). Handbook of Physiology. Sección 2: The Cardiovascular System. Editado por Berne R. M. Washington D. C. pp: 581-620.
 73. Schmid P. G., Dykstra R. H., Mayer H. E., Oda R. P., Donnell J. J. (1979). Ann. J. Physiol. 237: H 606-611.
 74. Angelakos E. T., Fuxe K., Toshiana M. L. (1963). Acta Physiol. Scand. 59: 184-192.
 75. Brown O. M. (1976). Ann. J. Physiol. 231: 781-785.
 76. Kent K. M., Epstein S. E., Cooper T., Jacobowitz D. M. (1974). Circulation 50: 948-955.
 77. Scholtz H. (1980). Adrenergic activators and inhibitors. Parte I. Editado por Szekenes L., Nueva York. pp: 651-712.
 78. De Geest H., Levy M. N., Zieske H., Lipman R. I. (1965). Circ. Res. 17: 222-235.
 79. Higgins C. B., Vatner S. F., Braunwald E. (1973). Pharmacol. Rev. 25: 120-155.
 80. Trump B. F., Berezesky I. K., Usornio-Vargas A. R. (1981).

- J. Cell. Biol. 91: 282 a.
81. Piwnica-Worms D. R., Jacob R., Horres C. R., Lieberman M. (1985). J. Gen. Physiol. 85: 43-64.
 82. Neely J. R., Grotoykann L. W. (1984). Circ. Res. 55: 816-824.
 83. Buja L. M., Hagler H. K., Parsons D., Chien K., Reynolds R. C., Willerson J. (1985). Lab. Invest. 53: 397-412.
 84. Murphy E., Lefurgey A., Lieberman M. (1987). Ann. J. Physiol. 253: C 700-706.
 85. Hasin Y., Barry W. (1984). Ann. J. Physiol. 247: H 322-329.
 86. Rodemann H. P., Waxman L., Goldberg A. L. (1982). J. Biol. Chem. 257: 8716-8723.
 87. Levi R., Burke J. A., Corey E. J. (1982). Adv. in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Res., Vol. 9. Editado por Samuelsson B., Paoletti R., Raven Press, New York. pp: 215-221.
 88. Alexander R. W., Williams L. T., Lefkowitz R. J. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72: 1564-1568.
 89. Harden T. K., Wolfe B. B., Molinoff P. B. (1976). Mol. Pharmacol. 12: 1-15.
 90. Kravietz W., Poppert D., Erdmann E., Glossmann H., Struck C. J., Konrad C. (1976). Naunyn Sch's Arch. Pharmacol. 295: 215-224.
 91. Marsh J. D., Barry W. H., Neer E. J., Alexander R. W., Smith T. W. (1980). Circ. Res. 47: 493-501.
 92. Wei J. W., Sulakhe P. V. (1979). Gen. Pharmacol. 10: 263-

267.

93. Williams R. S., Lefkowitz R. J. (1978). *Circ. Res.* 44: 72-77
94. Schumann H. J., Brodde O. E. (1979). *Naunyn Sch's Arch. Pharmacol.* 308: 191-198.
95. Cheng J. B., Cornett L. E., Goldfien A., Roberts J. M. (1980). *Br. J. Pharmacol.* 70: 515-517.
96. Brown J. H., Buxton I. L., Brunton L. L. (1985). *Circ. Res.* 57: 532-537.
97. Lands A. M., Arnold A., Mc Auliff J. P., Luduena F. P., Brown T. G. (1967). *Nature* 214: 597-598.
98. Phillips D. K. (1980). *Adrenergic activators and inhibitors, parte I, op. cit. pp: 3-61.*
99. Minneman K. P., Hegstrand L. R., Molinoff P. B. (1979). *Mol. Pharmacol.* 16: 34-46.
100. Lathers C. M., Levin R. M., Spivey W. H. (1986). *Eur. J. Pharmacol.* 130: 111-117.
101. Hedberg A., Minneman K. P., Molinoff P. B. (1980). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213: 503-508.
102. Robberecht P., Delahaye M., De Neff P., Waelbroeck M., De Smet J. M., Leclerc J. L., Chatelain O., Cristophe J. (1983). *Mol. Pharmacol.* 24: 169-173.
103. Bryan L. J., Cole J. J., O'Donnell S. R., Wanstall J. C. (1981). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216: 395-400.
104. Carlsson E., Dahlof C. G., Hedberg A., Persson H., Tangstrand B. (1977). *Naunyn Sch's Arch. Pharmacol.* 300: 101-105.

105. Ablad B., Carlsson E., Dahlof C., Ek L., Hultberg E. (1974). *Adv. Cardiol.* 12: 290-302.
106. Sutherland E. W., Rall T. W. (1960). *Pharmacol. Rev.* 12: 265-299.
107. Brostrom M. A., Reimann E. M., Walsh D. A., Krebs E. G. (1970). *Adv. Enzyme Regul.* 8: 191-203.
108. Tada M., Katz A. M. (1982). *Ann. Rev. Physiol.* 44: 401-423.
109. Gilman A. G. (1984). *Cell* 36: 577-579.
110. Kurose H., Ui M. (1983). *J. Cyclic Nucleotide Res.* 9: 305-318.
111. Sabol S. L., Nirenber G. M. (1979). *J. Biol. Chem.* 254: 1913-1920.
112. Birnbaumer L., Codina J., Mattera R., Yatani A., Scherer N., Toro M. J., Brown A. M. (1987). *Kidney International* 32: 514-537.
113. Northup J. K., Sternweis P. C., Smigel M. D., Schleifer L. S., Ross E. M., Gilman A. G. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77: 6516-6520.
114. Codina J., Hildebrandt J. D., Iyengar R., Birnbaumer L., Sekura R. D., Manclark C. R. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80: 4276-4280.
115. Johnson G. L., Kaslow H. R., Bourne H. R. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 75: 3113-3117.
116. Codina J., Hildebrandt J. D., Birnbaumer L., Sekura R. D. (1984). *J. Biol. Chem.* 259: 11408-11418.
117. Brandt D. R., Ross E. M. (1985). *J. Biol. Chem.* 260: 266-272.

118. Dohlman H. G., Caron M. G., Lefkowitz R. J. (1987). *Biochemistry* 26: 2658-2664.
119. Kobilka B. K., Dixon R. A., Frielle T., Dohlman H. G., Bolanowski M. A., Sigal I. S., Yang-Feng T. L., Francke U., Caron M. G., Lefkowitz R. J. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84: 46-50.
120. Kubo T., Maeda A., Sugimoto K., Akiba I., Mikami A., Takahashi H., Haga T., Haga K., Ichiyama A., Kangawa K., Matsuo H., Hirose T., Numa S. (1986). *FEBS Lett.* 209: 367-372.
121. Benovic J. L., Mayor F., Somers R. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J. (1986). *Nature* 322: 869-872.
122. Kwatra M.M., Hosey M.M. (1986). *J. Biol. Chem.* 261: 12429-12432.
123. Sibley D. R., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J. (1988). *Endocr. Rev.* 9: 38-56.
124. Maguire M.E., Van Arsdale P.M., Gilman A. G. (1976). *Mol. Pharmacol.* 12: 335-339.
125. Mukherjee C., Caron M. G., Lefkowitz R.J. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 72: 1945-1949.
126. Harden T. K. (1983). *Pharmacol. Rev.* 35: 5-41.
127. Nambi P., Peters J. R., Sibley D. R., Lefkowitz R. J. (1985). *J. Biol. Chem.* 260: 2165-2171.
128. Stiles G. L., Caron M.G., Lefkowitz R. J. (1984). *Physiol. Rev.* 64: 661-743.
129. Wei W., Sulakhe P. (1978). *Eur. J. Pharmacol.* 52: 235-238.

130. Hammer R., Berrie C. P., Birdsall N. J. M., Burgen A. S. V. Hulme E. C. (1980). *Nature* 283: 90-92.
131. Doods H. N., Mathy M. J., Davidesko D., Van Charldorp K., De Jonge A., Van Zwieten P. (1987). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242: 257-262.
132. Mattera R., Pitts B. J. R., Entman M. L., Birnbaumer L. (1985). *J. Biol. Chem.* 250: 7410-7421.
133. Bonner T. I., Buckley N. J., Young A. C., Brann M. R. (1987). *Science* 237: 527-532.
134. Brown H. F. (1982). *Physiol. Rev.* 62: 505-530.
135. Hino N., Ochi R. (1980). *J. Physiol.* 307: 183-197.
136. Sakmann B., Noma A., Trautwein W. (1980). *Nature* 303: 250-253.
137. Pfaffinger P.J., Martin J. M., Hunter D. D., Nathanson N. M., Hille B. (1985). *Nature* 317: 536-538.
138. Yatani A., Codina J., Brown A. M., Birnbaumer L. (1986). *Science* 235: 207-211.
139. Soejima M., Noma A. (1984). *Pflugers Arch.* 400: 424-431.
140. Murad F., Chi Y. M., Rall T. W., Sutherland E. N. (1962). *J. Biol. Chem.* 237: 1233-1238.
141. Gardner R. M., Allen D. O. (1977). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 202: 346-353.
142. Brown S. L., Brown I. H. (1983). *Mol. Pharmacol.* 24:351-356.
143. Jakobs K. H., Aktories K., Schultz G. (1979). *Naunyn Sch's*

- Arch. Pharmacol. 310: 113-119.
144. Malbon C. C., Mangano T. J., Watkins D. C. (1985). Biochem. Biophys. Res. Comm. 128: 809-815.
145. Kurose H., Katada T., Amano T., Ui M. (1983). J. Biol. Chem. 258: 4870-4875.
146. Reuter H. (1983). Nature 301: 569-574.
147. Hartzell H. C., Titus L. (1982). J. Biol. Chem. 257: 2111-2120.
148. Watanabe A. M., Lindemann J. P., Jones L.R., Besch H. R., Bailey J. C. (1981). Disturbances in Neurogenic Control of the Circulation. Edited por Abboud F. M., Fozzard H. A., Gilmore J. P., Reis D. J. Waverly Press, Baltimore. pp: 189-203.
149. Linden J., Brooker G. (1979). Biochem. Pharmacol. 28: 3351-3360.
150. Endoh M., Schimizu T. (1979). Jpn. J. Pharmacol. 29: 423-433.
151. Nawrath H. (1977). Nature 267: 72-74.
152. Lincoln T. M., Keely S. L. (1980). J. Cyclic Nucleotide Res. 6: 83-91.
153. Ray K. P., England P. J. (1976). FEBS Lett. 70: 11-16.
154. Horowitz R., Winegrad S. (1983). J. Mol. Cell. Cardiol. 15: 277-280.
155. Rodger I. W., Shahid M. (1984). Br. J. Pharmacol. 81: 151-159.

156. Robberecht P., Waelbroeck M., Claeys M., Nguyen Huu A., Chatelain P., Cristophe J. (1981). *Mol. Pharmacol.* 21: 589-593.
157. Carrier G. O., Edwards A. D., Aronstam R. S. (1984). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 16: 963-972.
158. Halvorsen S. W., Nathanson M.M. (1981). *J. Biol. Chem.* 256: 7941-7948.
159. Birdsall N. J. M., Hulme E. C., Stockton J. M. (1984). *Trends Pharmacol. Sci Supl.* 1: 4-8.
160. Wei W., Sulakhe P. V. (1980). *Naunyn Sch's Arch. Pharmacol.* 314: 305-318.
161. Wei W., Sulakhe P. V. (1979). *Naunyn Sch's Arch. Pharmacol.* 309: 259-269.
162. Rojas F. G., Iyengar R., Birnbaumer L. (1985). *J. Biol. Chem.* 260: 7829-7835.
163. Lands W.E.M., Samuelsson B. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 164: 426-429.
164. Weiglicki W. B., Waite M., Sisson P., Shoheit S. B. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 231: 512-519.
165. Piper P. J. (1984). *Physiol. Rev.* 64: 744-761.
166. Samuelsson B., Borgeat P., Hammarstrom S., Murphy R. C. (1979). *Prostaglandins* 17: 785-787.
167. Morris H. R., Taylor G. W., Piper P. J., Tippins J. R. (1980). *Nature* 285: 104-106.
168. Samuelsson B. (1983). *Science* 220: 568-575.

169. Feuerstein G. (1984). Prostaglandins 27: 781-801.
170. Letts L. G., Piper P. J. (1982). Br. J Pharmacol 76: 169-176.
171. Fergen G. A., Prager D. J. (1969). Am. J. Cardiol. 24: 474-491.
172. Capurro N., Levi R. (1975). Circ. Res. 36: 520-523.
173. Levi R., Burke J. A. (1980). Eur. J. Pharmacol. 62: 41-49.
174. Burke J. A., Levi R., Guoz G., Corey E. J. (1982). J. Pharmacol. Exp. Ther. 221: 235-241.
175. Letts L. G., Piper P. J. (1982). Adv. Prostaglandins Thromboxanes and Leukotrienes Res., op. cit., Vol. 11. pp: 391-396.
176. Burke J. A., Levi R., Gleason J. G. (1984). J. Cardiovasc. Pharmacol. 6: 122-125.
177. Burke J. A., Levi R., Corey E. J. (1984). Fed. Proc. 40: 1015.
178. Michelassi F., Landa L., Hill R. D., Lewenstein E., Watkins W. D., Petkav A. J., Zapol W. M. (1982). Science 217: 841-843.
179. Zukowska-Grojec Z., Bayorh M. A., Kopin I. J., Feuerstein G. (1982). J. Pharmacol. Exp. Ther. 223: 183-187.
180. Iacopino V. J., Fitzpatrick T. M., Ramwell P. W., Rose C., Kot P. A. (1982). Clin. Res. 39: 19 A.
181. Karmazyn M., Moffat M. P. (1984). J. Mol. Cell. Cardiol. 16: 1071-1073.

182. Ikeda U., Toyo-Oka T., Arisaka H., Hosoda S. (1987). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 19: 523-526.
183. Fowler N. O. (1965). *Progr. Enf. Cardiovasc.* 5: 1-17.
184. Harvey W. P., Segal J. P., Gurel T. (1965). *Progr. Enf. Cardiovasc.* 5: 17-42.
185. Katz A. M. (1977). *Physiology of the Heart*, op. cit., pp: 397-418.
186. Rosenbaum M. B. (1965). *Progr. Enf. Cardiovasc.* 5: 203-230.
187. Chagas C. (1909). *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
188. Texeira M. L., Dvorak J. A. (1985). *J. Protozool.* 32: 339-343.
189. Snary D. (1985). *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 587-590.
190. Ouassi M. A., Afchain D., Captron A., Grimaud J. A. (1984). *Nature* 308: 380.
191. Acosta A. M., Sadigursky M., Santos Buch C. A. (1983). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 172: 364-369.
192. Molina H. A., Milei J., Storino R. (1984). *Cardiology* 71: 297-306.
193. Borda E., Pascual J., Cossio P. M., De La Vega M., Arana R., Sterin-Borda L. (1984). *Clin. exp. Immunol.* 57: 679-686.
194. Sterin-Borda L., Cantore M., Pascual J., Borda E., Cossio P.M., Arana R., Passerón S. (1986). *Int. J. Immunopharmacol.* 8: 581-588.

195. Bracco M.M., Sterin-Borda L., Fink S., Finiaz M., Borda E. (1984). Clin. exp. Immunol. 55: 405-412.
196. Acosta A. M., Santos Buch C. A. (1985). Circulation 71: 1255-1261.
197. Santos Buch C. A., Texeira A. R. L. (1974). J. Exp. Med. 140: 38-53.
198. Texeira A. R. L., Texeira G., Macedo V., Prata A. (1978). Am. J. Trop. Med. Hyg. 27: 1097-1107.
199. Cossio P. M., Laguens R. P., Kreutzer E., Diez C. Segal A. Arana R. M. (1977). Am. J. Pathol. 86: 533-544.
200. Laguens R. P., Cabeza Meckert P., Chambo G., Gelpi R. (1981). Medicina 41 (Bs.As.): 40.
201. Santos Buch C. A., Acosta A. M., Zweering M. J., Sadigursky M., Andersen O. F., Von Kreuter B. F., Brodskyn C. I., Sadigursky C., Cody R. J. (1985). Clin. Immunol. Immunopathol. 37: 334-340.
202. Koberle F. (1974). Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease. Ciba Foundation Symposium 20. Ass. Sci. Publ., Nueva York, pp: 137-158.
203. Reyes M. P., Lerner A. M. (1985). Progr. Cardiovasc. Dis. 27: 373-394.
204. Woodruff J. F. (1980). Am. J. Pathol. 101: 427-479.
205. Lowry P. J., Thompson R. A., Littler W. A. (1983). British Heart J. 50: 390-394.
206. Maish B., Deeg P., Lieban G., Kochsiek K. (1983). Am. J. Cardiol. 52: 1072-1078.

207. Das S. K., Petty R. E., Meengs W. L., Tubergen G. (1976).
Circulation 53/54, Supl. 2: 22.
208. Anderson J. L., Carlquist J. F., Hammond E. H. (1982).
Lancet 2: 1124-1127.
209. Alvarez F., Neu N., Rose N. R., Craig S. W., Beisel K. W.
(1987). Clin. exp. Immunol. 43: 129-139.
210. Neu N., Beisel K. W., Traystman M. D., Rose N. R., Craig S.
W. (1987). J. Immunol. 138: 2488-2492.
211. Woodruff J. F., Woodruff J. J. (1974). J. Immunol. 113:
1726-1734.
212. Wong C. Y., Woodruff J. J., Woodruff J. F. (1977). J.
Immunol. 118: 1159-1164.
213. Pague R. E., Gauntt C. J., Nealon T. J., Trousdale M. D.
(1978). J. Immunol. 120: 1672-1678.
214. Kaplan M. H., Svec K. H. (1964). J. Exp. Med. 119: 651-655.
215. Kuch J. (1973). Cardiovasc. Res. 7: 649-654.
216. Maish B., Berg P. A., Kochsiek K. (1979). Clin. exp.
Immunol. 38: 189-197.
217. Zabriskie J. B., Hsu K. C., Seegal B. C. (1970). Clin. exp.
Immunol. 7: 147-159.
218. Van de Rijn I., Zabriskie J. B., Mc Carty M. (1977). J. Exp.
Med. 146: 579-597.
219. Kaplan M. H., Frengley J. D. (1969). Am. J. Cardiol. 24:
459-473.

220. Khatib R., Probert A., Reyes M. P., Khatib G., Chason J. L. (1987). *J. Gen. Virol.* 68: 2981-2988.
221. Texeira A., Texeira M., Santos Buch C. A. (1975). *Am. J. Pathol.* 80: 163-180.
222. Laguens R. P., Cabeza Meckert P., Basombrio M. A., Chambó G. J., Cossio P. M., Arana R. M., Gelpi R. (1980). *Medicina (Bs.As.)* 40 (Supl. 1): 33-39.
223. Basombrio M. A., Besuschio S., Cossio P. M. (1982). *Infect. Immunity* 36: 342-350.
224. Cossio P. M., De La Vega M., Basombrio M. A., Casanova M. B., Bolomo N., Milei J., Arana R., Alonso D. (1983). *Medicina (Bs. As.)* 43: 517-524.
225. González Cappa S., Lazzari J., Segal A., Katzin A., Mistchenko A., Laguens R. P., Elizari M. (1977). *Medicina (Bs. As.)* 37: 508.
226. Kaplan M., Craig J. (1963). *J. Immunol.* 90: 725-733.
227. Davies A. M., Laufer A., Gery I., Rosenmann E. (1964). *Arch. Pathol.* 78: 369-376.
228. Basili R., Koerner E., Zuloaga G., Laguens R., Bidoggia H. (1970). *Medicina (Bs. As.)* 30: 255-260.
229. Cossio P. M., Bustuoabad O., Paterno E., Iotti R., Casanova M., Podestá M., Bolomo N., Arana R. M., Pasqualini C. D. (1984). *Clin. Immunol. Immunopathol.* 33: 165-175.
230. Laguens R. P., Chambó J., Laguens G., Cabeza Meckert P. (1986). *Medicina (Bs. As.)* 46: 553.
231. Wittner B., Maisch B., Kochsiek K. (1983). *J. Immunol. Methods* 64: 239-248.

232. Neu N., Rose N. R., Beisel K. W., Herskowitz A., Gurri-Glass G., Craig S. W. (1987). *J. Immunol.* 139: 3630-3636.
233. Johnson G. D., Holborow E. J., Dorling J. (1978). *Handbook of Experimental Immunology*. Vol. I. Editado por Weir D. M., Blackwell Sci. Publ., Oxford. pp: 15.1-15.30.
234. Margni R. A. (1989). *Inmunologia e Inmunoquimica*. Editorial Panamericana, Buenos Aires. pp: 528-529.
235. Simpson P., Savion S. (1982). *Circ. Res.* 50: 101-116.
236. Argyris B. F. (1981). *Cell. Immunol.* 62: 412-424.
237. Stuart A. E., Habeshaw J. A., Davidson A. E. (1978). *Handbook of Experimental Immunology*, op. cit., Vol II. pp: 31.1-31.30.
238. Greene M. I., Sunsy M., Kripke M., Benacerraf B. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76: 6591-6595.
239. Julius M. H., Simpson E., Herzenberg L. A. (1973). *Eur. J. Immunol.* 3: 645-649.
240. Henry C. (1980). *Selected Methods in Cellular Immunology*. Editado por Mishell B. B. y Shiigi S. M., W. H. Freeman Co., San Francisco. pp: 173-182.
241. Heide K., Schwick H. G. (1978). *Handbook of Experimental Immunology*, op. cit., Vol. I. pp: 7.1-7.11.
242. Fahey J. L., Terry E. W. (1978). *Handbook of Experimental Immunology*, op. cit., Vol. III. pp: 8.1-8.16.
243. Lowry O. H., Rosebrough R. P., Farr A. L., Randall R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
244. Outcherlony O., Nilsson L. A. (1978). *Handbook of*

- Experimental Immunology, op. cit., Vol. I. pp: 19.1-19.44.
245. Sterin-Borda L., Gimeno A. L., Gimeno M. F. (1974). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145: 1151-1157.
246. Van Rossum J. M. (1963). Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 143: 239-319.
247. Limas C. J. (1979). Biochim. Biophys. Acta 588: 174-178.
248. Limas C., Limas C. J. (1978). Biochem. Biophys. Res. Comm. 83: 710-712.
249. Williams L. T., Snyderman R., Lefkowitz R. J. (1976). J. Clin. Invest. 57: 149-155.
250. Meurs H., Van der Bogaard W., Kauffman H. F., Bruynzeel P. L. B. (1982). Eur. J. Pharmacol. 85: 185-194.
251. Williams L. T., Jarett L., Lefkowitz R. J. (1976). J. Biol. Chem. 251: 3096-3101.
252. Scatchard G. (1949). Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660-672.
253. Zivin J. A., Waud D. R. (1982). Life Sci. 30: 1407-1422.
254. Waelbroeck M., Robberecht P., Chatelain P., Christophe J. (1982). Mol. Pharmacol. 21: 581-588.
255. Taccone E., Silva E., Cossio P. M., Arana R. M., Croxatto O. (1973). Medicina (Bs. As.) 33: 629.
256. Esteva M., Ruiz A., Cabeza Meckert P., Cazzulo J. J., Segura E. (1983). J. Protozool. 30: 168.
257. Segura E., Cabeza Meckert P., Esteva M., Gelpi R., Campanini

- A. R., Subias E., Laguens R. P. (1980). Medicina (Bs. As.) 40: 807.
258. Wolfgram L. J., Beisel K. W., Herskowitz A., Rose N. R. (1986). J. Immunol. 136: 1846-1852.
259. Cossio P. M., Casanova M. B., Bellido C., Arce L., Storino R., De La Vega M. T., Diez C., Arana R. M. (1985). Medicina (Bs. As.) 45: 463-468.
260. Arraes-Hermans M. A., Texeira M. L. (1979). Proc. del Congreso Internacional sobre a Doenca de Chagas, Rio de Janeiro. p:195.
261. Rosenberg H. S., Mc Namara D. G. (1965). Progr. Enf. Cardiovasc. 5: 183-202.
262. Marriot H. J. L. (1965). Progr. Enf Cardiovasc. 5: 101-115.
263. Marquard C., Schamroth L. (1986). Heart & Lung 15: 208-210.
264. Johnson H. G., Chinn D. R., Morton M. L., Mc Nee M. D., Miller M. D., Nadel J. A. (1983). Agents and Actions 13: 1-4.
265. Burke J. A., Levi R. (1980). Fed. Proc. 39: 389.
266. Wittmann G., Weinerowski P., Simmet T. H., Peskar B. A. (1988). Naunyn Sch's Arch. Pharmacol. 338: 577-581.
267. Folco G. C., Hansson G., Grastrom E. (1981). Biochem. Pharmacol. 30: 2491-2493.
268. Folco G. C., Omini C., Viganó T., Brunelli G., Rossoni G., Berti F. (1982). Leukotrienes and other Lipoxigenase Products. Editado por Samuelsson B. y Paoletti R, Nueva York. pp: 153-167.

269. Forster W., Mest H. J., Mentz P. (1973). Prostaglandins 3: 895-904.
270. Au T. L. S., Collins G. A., Harvie C. J., Walker M. J. A. (1979). Prostaglandins 18: 707-720.
271. Borda L. S., Canga L., Gimeno M. F., Gimeno A. L. (1979). *Experientia* 35: 529-531.
272. Coker S. J., Parratt J. R. (1983). *Br. J. Clin. Pharmacol.* 15(S 1): 87 S-95 S.
273. Parratt J. R., Wainwright C. L., Coker S. J., Zeitlin I. J. (1988). *Biomed. Biochim. Acta* 47: S 13-S 18.
274. Geissler W., Forster A., Schewe T., Rapoport S. M. (1988). *Biomed. Biochim. Acta* 47: S 311-S 314.
275. Zinkernagel R. M., Doherty P. C. (1979). *Adv. Immunol.* 27: 52-180.
276. Benacerraf B. (1981). *Science* 212: 1229-1238.
277. Schwartz R. H. (1985). *Ann. Rev. Immunol.* 3: 237-261.
278. Austyn J. H. (1989). *Antigen-presenting cells. Focus Series.* Male D. IRL Press, Oxford.
279. Pober J. S., Gimbrone M. A., Cotran R. S., Reiss C. S., Burakoff S. J., Fiers W., Ault K. A. (1983). *J. Exp. Med.* 157: 1339-1353.
280. Jansson R., Karlsson A., Forsum U. (1984). *Clin. exp. Immunol.* 58: 264-272.
281. Hanafusa T., Pujol-Borrell R., Chiovato L., Russell R. C. G., Doniach D., Bottazzo G. F. (1983). *Lancet* ii: 1111-1115.

282. Pujol-Borrell R., Todd I., Londei M., Foulis A., Feldmann M., Bottazzo G. F. (1986). *Mol. Biol. Med.* 3: 159-165.
283. Stern S. A., Dau P. C. (1987). *Clin. exp. Immunol.* 69: 508-515
284. Burnet M. F. (1972). *Autoimmunity and Autoimmune Disease*, op. cit. pp: 73-85.
285. Mc Farland (1969). *Science* 163: 818-820.
286. Cotran R. S., Gimbrone M. A., Bevilacqua M. P., Mendrick D. L., Pober J. S. (1986). *J. Exp. Med.* 164: 661-666.
287. Pober J. S. (1988). Tumor Necrosis Factor /cachectin and related cytokines. *Int. Conf. Tumor Necrosis Factor and related cytokines*, Heidelberg, 1987. Editado por Bonavida, Gifford, Kirchner Old, Basilea. pp: 74-81.
288. Genaro A. M., Borda E. S., Cremaschi G., Sterin-Borda L., Braun M. (1986). *Immunopharmacology* 11: 129-140.
289. Gulick Y., Chung M., Pieper S. J., Schreiner G. F. Lange L. G. (1988). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 150: 1-9.
290. Fink S., Finiaz M., Sterin-Borda L., Borda E., Bracco M. M. E. (1988). *Immunology Letters* 17: 183-188.
291. Fink S., Finiaz M., Sterin-Borda L., Borda E., Bracco M. M. E. (1989). *Int. J. Immunopharmacol.* 11: 367-370.
292. Honte Beyrie-Joskowicz A., Said G., Milon G., Marchal G., Eisen H. (1987). *Eur. J. Pharmacol.* 17: 1027-1034.
293. Wong C. Y., Woodruff J. J. (1977). *J. Immunol.* 118: 1165-1169.
294. Godeny E. K., Gauntt C. J. (1986). *J. Immunol.* 137: 1695-

1702.

295. Limas C. J., Goldemberg I. F., Limas C. (1989). *Circ. Res.* 64: 97-103.
296. Fingl E., Woodbury D. M. (1978). *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Editado por Goodman L. S. y Gilman A., México. pp: 1-40.
297. Calvo J. C., Torres H. N., Charreau E. H. (1985). *Endocrinología Molecular*. Editado por Calandra R. y De Nicola A. F., El Ateneo, Buenos Aires. pp: 1-19.
298. Kriss J. P., Pleshakov V., Chien J. R. (1964). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 24: 1005-1028.
299. Adams D. D. (1958). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 18: 699-712.
300. Manley S. W., Bourke J. R., Hawker R. W. (1974). *J. Endocrinol.* 61: 437-445.
301. Sterin-Borda L., Cossio P. M., Gimeno M., Gimeno A. L., Diez C., Laguens R. P., Cabeza Meckert P., Arana R. M. (1976). *Cardiovasc. Res.* 10: 613-622.
302. Fraser C. M., Venter J. C. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77: 7034-7038.
303. Venter J. C., Fraser C., Soiefer A. J., Jeffrey D. R., Strauss W. L., Charlton R. R., Greguski R. (1981). *Adv. Cycl. Nucleotide Res.* 14: 135-143.
304. Yatani A., Codina J., Imoto Y., Reeves J. P., Birnbaumer L., Brown A. M. (1987). *Science* 238: 1288-1292.
305. Sutherland E. W., Rall T. W. (1958). *J. Biol. Chem.* 232: 1077-1091.

306. Bonifacio E., Cobain T. J., Dawkins R. L., Griffiths M. (1988). *Autoimmunity* 1: 59-66.
307. Cremaschi G., Genaro A. M., Sales M. E., Sterin-Borda L. (1983). *Experientia* 39: 1026-1028.
308. Couraud P. O., Delavier-Klutchko C., Durieu-Trautmann O., Strosberg A. D. (1981). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 99: 1295-1302.
309. Strader C. D., Picker V. M., Joh T. H., Strohsacker M. W., Shorr R. G. L., Lefkowitz R. J., Caron M. G. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80: 1840-1844.
310. Shreiber A. B., Couraud P. O., André C., Vray B., Strosberg A. D. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77: 7385-7388.
311. Wrenn S., Haber E. (1979). *J. Biol. Chem.* 254: 6377-6382.
312. Jacobs S., Chang K. J., Cuatrecasas P. (1978). *Science* 200: 1283-1284.
313. Lindstrom J. (1977). *Receptors and Recognition*, Vol 13. Editado por Cuatrecasas P. y Greaves M. F., Chapman & Hill, Londres. pp: 1.
314. Greene G. L., Closs L. E., Fleming H., De Sombre E. R., Jensen E. V. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 74: 3681-3685.
315. Eder J., Arnon R. (1973). *Immunichemistry* 10: 535-543.
316. Patrick J., Lindstrom J. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 70: 3334-3338.
317. Patrick J., Lindstrom J. (1973). *Science* 180: 871-872.
318. Hornick C. L., Karush F. (1972). *Immunochemistry* 9: 325-

- 340.
319. Steward M. W. (1978). Handbook of Experimental Immunology, op. cit., Vol. I. pp: 16.1-16.20.
320. Nisonoff A., Pressman D. (1958). J. Immunol. 80: 417-425.
321. Day L. A., Sturtevant J. M., Singer S. J. (1963). Ann. N. Y. Acad. Sci. 103: 611-625.
322. Barisas B. G., Singer S. J., Sturtevant J. M., (1975). Immunochemistry 12: 411.
323. Froese J. (1968). Immunochemistry 5: 253-264.
324. Smith T. N., Skubitz K. M. (1975). Biochemistry 14: 1486-1502.
325. Petch I., Givol D., Sela M., Haselkorn D., Friedman S. (1972). FEBS Lett. 24: 331-334.
326. Fraser C., Greguski R., Eddy B., Venter J. C. (1983). J. Cell. Biochem. 21: 219-231.
327. Sterin-Borda L., Cremaschi G., Pascual J., Genaro A., Borda E. (1984). Clin. exp. Immunol. 58: 223-228.
328. Homcy C. J., Rockson S. G., Haber E. (1982). J. Clin. Invest. 69: 1147-1154.
329. Cremaschi G., Genaro A. M., Sterin-Borda L. (1989). Molecular Immunol. 26: 601-609.
330. Evans T., Hepler J. R., Masters S. B., Brown J. H., Harden T. K. (1986). J. Biol. Chem. 261: 4071-4075.
331. Wei J. W., Sulakhe P. V. (1980). Eur. J. Pharmacol. 62: 345-

347.

332. Sterin-Borda L., Perez Leiros C., Wald M., Cremaschi G., Borda E. (1988). Clin. exp. Immunol. 74: 349-354.
333. Blecher M., Lewis S., Hicks J. M., Josephs S. (1984). J. Allergy Clin. Immunol. 74: 246-251.
334. Fraser C. M., C. Venter J. (1984). J. Allergy Clin. Immunol. 74: 227-229.
335. Fraser C. M., Harrison L. C., Kaliner M. C., C. Venter J. (1980). Clin. Res. 28: 236 A.
336. Kahn C. R., Flier J. S., Bar R. S. (1976). N. England J. Med. 294: 739-745.
337. Zakarija M., Mc Kenzie J. M., Banovac K. (1980). Ann. Intern. Med. 93: 28-32.

Cherilyn

[Handwritten signature]