

Tesis de Posgrado

Mecanismos inmunes citotóxicos contra el Trypanosoma Cruzi

Olabuenaga, Susana E.

1980

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

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

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

Cita tipo APA:

Olabuenaga, Susana E.. (1980). Mecanismos inmunes citotóxicos contra el Trypanosoma Cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1645_Olabuenaga.pdf

Cita tipo Chicago:

Olabuenaga, Susana E.. "Mecanismos inmunes citotóxicos contra el Trypanosoma Cruzi". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1645_Olabuenaga.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES.

"MECANISMOS INMUNES CITOTOXICOS
CONTRA EL TRYPANOSOMA CRUZI"

1645

Realizada en: Sección Inmunología, Instituto de Investigaciones
Médicas, U.B.A.

Autor: Susana E. Olabuenaga

Director de Tesis: Dra. María Marta de Elizalde de Bracco

Consejera de Estudios: Dra. Ana María Brunengo

Año: 1980

A mis padres

INDICE

<u>OBJETIVO</u>	6
<u>INTRODUCCION</u>	
A. <u>La Enfermedad de Chagas. Breve Introducción</u>	8
B. <u>Trypanosoma cruzi</u>	
1. Morfología	10
2. Ciclo de Vida	12
3. Posición Taxonómica	13
4. Vectores	16
C. <u>Signos Clínicos</u>	
1. Fase Aguda	17
2. Fase Latente	19
3. Fase Crónica	19
D. <u>Respuesta inmune a parásitos</u>	21
E. <u>Respuesta inmune en la Enfermedad de Chagas</u>	
1. Respuesta Humoral	25
2. Respuesta Celular	26
F. <u>Citotoxicidad mediada por células</u>	29
I. <u>Citotoxicidad Extracelular</u>	29
1. Células Inmunes	29
2. Células No Inmunes	30
a. Células "Natural Killer" ó "NK"	30
b. Monocitos y Macrófagos	33
c. Linfocitos "Killer" ó Asesinos	34
d. Linfocitos "Killer", Monocitos, Macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (PMN)	37
e. Leucocitos Polimorfonucleares (PMN)	39
1. Citotoxicidad dependiente de Anticuerpo (Ac)	39

2. Endocitosis Reversa	40
3. Liberación de Agentes Oxidantes	41
4. Diferentes clases de Células Blanco afectadas por los Leucocitos PMN en reacciones de Citotoxicidad Extracelular mediada por Anticuerpo.	48
a. Células Tumorales	48
b. Células infectadas por Virus	50
c. Eritrocitos	51
d. Parásitos	52

II. Citotoxicidad Intracelular 53

MATERIALES Y METODOS

A. <u>Células Blanco</u>	65
B. <u>Marcaje de las Células Blanco</u>	65
C. <u>Pretratamiento de las Células Blanco</u>	66
D. <u>Células Efectoras</u>	67
1. Obtención de leucocitos periféricos totales	67
2. Purificación de leucocitos periféricos totales	67
3. Recuento Celular	68
E. <u>Antisueros</u>	68
F. <u>Purificación parcial de γ-globulina del antisuero de conejo</u>	69
G. <u>Purificación de los sueros de pacientes chagásicos crónicos</u>	69
H. <u>Pruebas Serológicas</u>	70
I. <u>δ-globulina agregada</u>	70
J. <u>Reacción Citotóxica</u>	71
K. <u>Viabilidad de los leucocitos de sangre periférica</u>	72
L. <u>Reacción de Fagocitosis</u>	73

M. Reacción de Citotoxicidad y Fagocitosis en paralelo	78
N. Liberación de Uridina- ³ H de los PMN	79

RESULTADOS

I. <u>ACCION CITOTOXICA DEPENDIENTE DE ANTICUERPO</u>	82
A. <u>Acción citotóxica de los leucocitos humanos periféricos</u>	82
1. Prueba de distintos antisueros	85
2. Pretratamiento de las células efectoras y blanco con suero anti <u>T.cruzi</u> ó suero control	87
3. Cinética de la reacción	89
4. Viabilidad de las células efectoras	90
B. <u>Acción citotóxica de los leucocitos mono y polimorfonucleares humanos</u>	92
1. Identificación de la célula efectora	92
2. Efecto de la centrifugación inicial	95
3. Cinética de la reacción	97
4. Dependencia de la concentración de anticuerpo y de las células efectoras	99
5. Clases de Anticuerpo involucradas	102
6. Inhibición de la reacción con γ -globulina agregada	104
7. Experimento de células "inocentes"	105
II. <u>ACTIVIDAD FAGOCITICA DEPENDIENTE DE ANTICUERPO DE LEUCOCITOS PMN HUMANOS</u>	
1. Cinética de la reacción	106
2. Dependencia de la concentración de anticuerpo y de las células efectoras	109

III. SECUENCIA DE LA FAGOCITOSIS Y DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS
LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS

1. Cinética de ambas reacciones 111
2. Dependencia de la relación célula efectora:célula blanco
y de la concentración de anticuerpo 114
3. Liberación de Uridina tritiada de los PMN. 117

DISCUSION 119

CONCLUSIONES 126

REFERENCIAS 128

OBJETIVOS

Esta tesis intenta representar un aporte al estudio de la Enfermedad de Chagas, la cual afecta en forma endémica a nuestro país.

El diagrama consta de 4 partes fundamentales: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión.

En la Introducción se enuncian en primer lugar los aspectos generales de la Enfermedad (parásito que lo produce, vector, ciclo de vida y signos clínicos); luego ciertas consideraciones generales sobre inmunidad, en las enfermedades parasitarias, y los mecanismos de inmunidad celular y humoral operantes; haciendo especial énfasis en la "Tripanosomiasis Americana". Finalmente, paso a describir los mecanismos de destrucción de una célula efectora contra diferentes células blanco (célula tumoral, célula infectada con virus, eritrocito, parásito). Debido a la participación de los leucocitos PMN como células efectoras en diferentes sistemas incluyendo parásitos y considerando la importancia que este fenómeno tendría en el control de la diseminación parasitaria en el transcurso de la enfermedad, el objetivo de este proyecto será caracterizar los mecanismos inmunes específicos que puedan participar en la resistencia a dicha infección.

El plan a seguir será el siguiente:

- a) Determinar si los leucocitos periféricos de sangre humana normal son capaces de inducir una reacción de citotoxicidad dependiente de Ac contra la forma de cultivo del parásito. De ser positivo se caracterizará en base a técnicas de purificación, las poblaciones efectivas en producir el efecto.
- b) Determinar si este efecto citolítico es ejercido no sólo en presencia de suero de animales inmunizados, sino también en presencia de suero de pacientes chagásicos crónicos; implicando esto último, que el Ac específico podría ejercer in vivo una barrera contra la diseminación del parásito.

- c) Determinar qué tipo de Inmunoglobulina interviene en la reacción.
- d) Determinar el desarrollo de la reacción en el transcurso del tiempo y su dependencia con respecto a la concentración de Ac y del número de células efectoras.
- e) Determinar si los leucocitos PMN, células fagocíticas por excelencia, son capaces de, matar intracelularmente al parásito.
- f) Caracterizar la reacción de fagocitosis: cinética, dependencia de la concentración de Ac y del número de células efectoras.
- g) Determinar la relación existente entre citotoxicidad y Fagocitosis, tratando de establecer cuales son los diferentes pasos para producir la lisis.

El modelo experimental seleccionado será el siguiente:

Se utilizarán como células efectoras leucocitos periféricos aislados de sangre humana normal. Se utilizarán también células monocleares y leucocitos PMN o granulocitos purificados.

Las células blanco serán las formas de cultivo del parásito o sea la forma epimastigote de T.cruzi de la cepa Tulahuén, que se cultivarán en medio de cultivo a 28°C y marcarán con Uridina tritiada.

Como anticuerpo específico, se utilizarán suero de conejos inmunizados con homogeneizado total de epimastigotes de T.cruzi o suero de pacientes chagásicos crónicos.

La evaluación se realizará de la siguiente forma:

- a) Citotoxicidad Dependiente de Anticuerpo por liberación del isótopo al sobrenadante siendo esta una medida del daño producido
- b) Fagocitosis por incorporación de los parásitos marcados a las células efectoras.

Creemos que el modelo experimental seleccionado in vitro sera útil y sensible y posiblemente constituirá un instrumento valioso para poder explorar la participación de los leucocitos PMN en el control de la infección.

A. La Enfermedad de Chagas

Introducción

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas (1) es una de las enfermedades infecciosas más ampliamente distribuidas en América Latina, constituyendo así un importante problema sanitario.

El Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, parásito causante de esta enfermedad, tiene una amplia distribución en América del Sur y Central, donde infecta una variedad de huéspedes vertebrados no relacionados filogenéticamente. Con la posible excepción de Belize Guyana, Surinam y las islas del Caribe, la enfermedad es endémica en todo el territorio que se extiende desde la frontera mejicano-estadounidense hasta la Patagonia, siendo altamente endémica en Brasil, Venezuela y Argentina.

La existencia de la enfermedad en el hombre, está correlacionada con las condiciones sociales y económicas; siendo las poblaciones rurales, que viven en condiciones precarias de vivienda, -- con mayor grado de analfabetismo, mortalidad infantil, enfermedades parasitarias y desnutrición, las más severamente afectadas.

De acuerdo con estimaciones de la Organización Mundial de la Salud están infectadas 7×10^6 personas y cerca de 30×10^6 están expuestas al riesgo de contraer la enfermedad. (2) Se calcula, que en la Argentina existen $2,3 \times 10^6$ infectados y más de 400.000 padecen la cardiopatía chagásica. Un 50% de la población vive en el área endémica, ya que ésta abarca el 90% de nuestro territorio, estando así expuestas a la infección.

La enfermedad es incurable, pero raramente letal. No se ha -- descubierto un agente quimioterapéutico que sea ampliamente aplicable.

La enfermedad es una entidad clínica compleja, y estudios recientes indicarían la existencia de una vinculación entre la respuesta inmune del huésped y sus variadas manifestaciones patológicas. (3)

B. Trypanosoma cruzi

1. Morfología

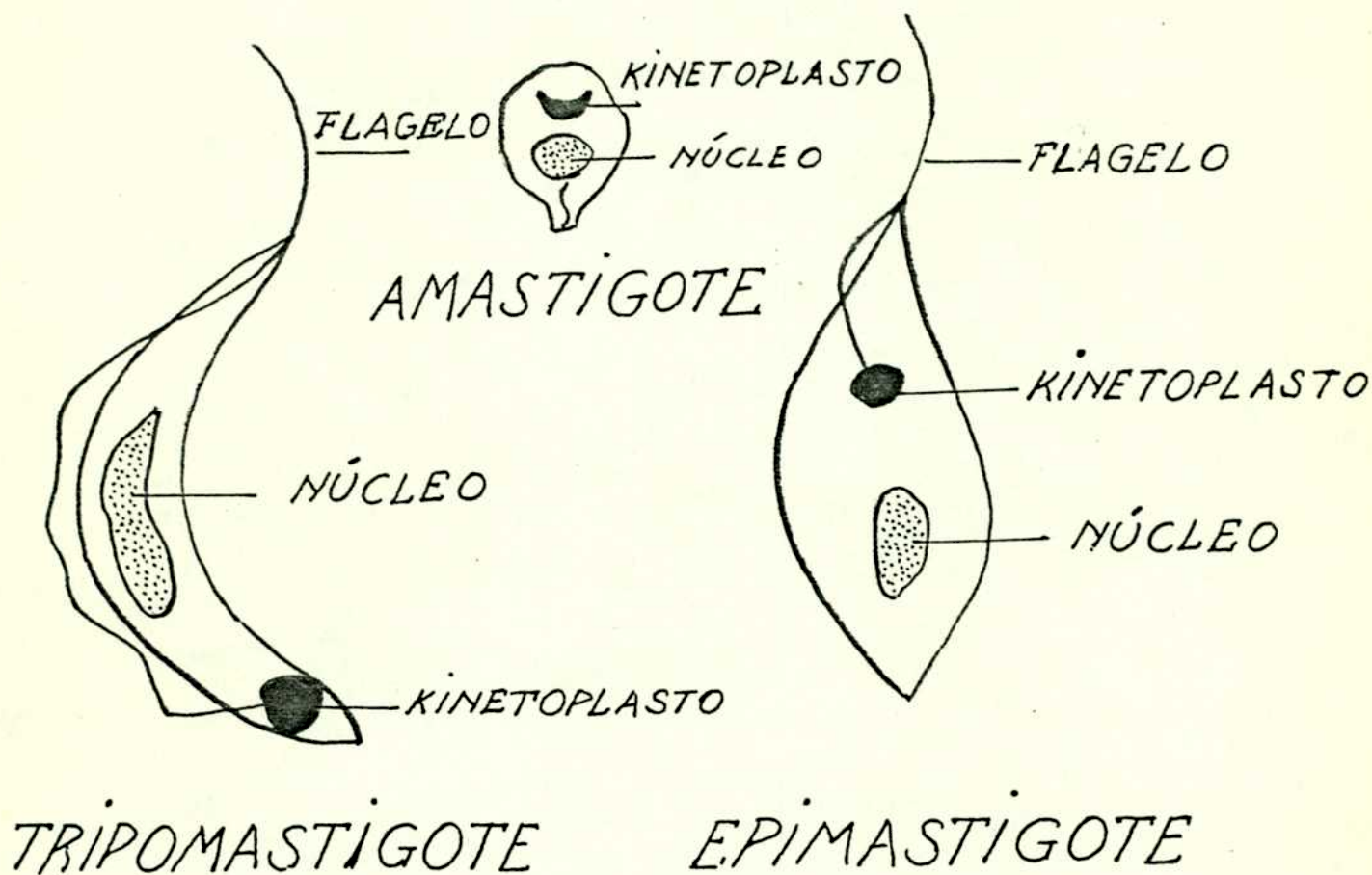
El Trypanosoma cruzi (T. cruzi) existe en tres formas distintas, dependiendo del medio en el cual se encuentra: amastigote, epimastigote y tripomastigote (Ver Figura 1).

El amastigote es de forma esférica a oval, de 2 a 4 μ m. de diámetro, tiene un flagelo muy corto o carece de él, y constituye la forma de división que se encuentra intracelularmente en los pseudocistos ó "nidios de parásitos" localizados en los tejidos del huésped mamífero.

El epimastigote tiene el kinetoplasto localizado en la zona anterior al núcleo; es de forma elongada, de 20 μ m. de longitud, tiene un flagelo libre y constituye la forma de multiplicación que se encuentra en el tracto digestivo del vector así como en cultivos o medios de cultivo artificiales.

El tripomastigote tiene el kinetoplasto localizado en la zona posterior al núcleo. Tiene 20 μ m. de longitud, un flagelo y una membrana ondulante que se extiende todo a lo largo del organismo. Esta es la forma que se encuentra en circulación, en la sangre de los mamíferos infectados, es responsable de la infección intracelular en estos huéspedes y de transmitirla al vector triatómico.

Fig. 1: Diferentes formas del
Trypanosoma cruzi



2. Ciclo de Vida

El ciclo de vida de T. cruzi es ilustrado en la Figura 2 . Como se puede observar el vector es infectado por ingestión de tripomastigotes presentes en sangre periférica de un mamífero infectado. Los organismos se dividen como epimastigotes en el intestino medio del vector y durante un período de 2 a 4 semanas se desarrollan como tripomastigotes metacíclicos en la ampolla rectal del triatomídeo (4). Estas formas infectivas son excretadas con las heces, durante la alimentación del vector, transmitiendo así la infección al huésped, entrando por una abrasión de la piel o a través de membranas mucosas intactas, como la conjuntiva. Este tipo de transmisión se denomina "contaminativa" o "por la parte posterior" a diferencia de la Tripanosomiasis Africana en la cual la forma infectiva es introducida por el vector a través del aparato bucal y se denomina por lo tanto "transmisión inoculativa" o "por la parte anterior" (2).

Existen otras formas de transmisión aunque ocurren en menor proporción; así la infección puede ser transmitida al feto a través de la placenta, o sea transmisión materna y de este modo la enfermedad se adquiere en forma congénita, confirmada clínicamente y por estudios anatómo-patológicos (5) por transfusión sanguínea (5); por accidente de laboratorio (6); por transmisión oral, a través de alimentos contaminados con las heces de triatomídeos o a través de leche materna. (7)

Después de 1 a 2 semanas de establecida la infección los tripanosomas comienzan a migrar desde el sitio de entrada, ingresan a la corriente sanguínea y producen un estado septicémico con extensa metástasis. Luego estos dejan la corriente sanguínea, e invaden los

tejidos del huésped, preferentemente células de la glia y músculo. Una vez adentro de la célula, se transforma inmediatamente en la forma amastigote, y se multiplica por división binaria dentro del pseudocisto que se produjo en la célula infectada. Después de --- aproximadamente 5 días, un cierto número de amastigotes se trans-- forman en tripomastigotes maduros, los cuales rompen el pseudocis-- to, entran en circulación y perpetúan la infección dentro del hués-- ped vertebrado por invasión de nuevas células.

Posición Taxonómica

Phylum: Protozoa

Subphylum: Sarcomastigophora

Superclase: Mastigophora

Clase: Zoomastigophora

Orden: Kinetoplastida

Suborden: Trypanosomatina

Familia: Trypanosomatidae

Género: Trypanosoma

Subgénero: Schizotrypanum

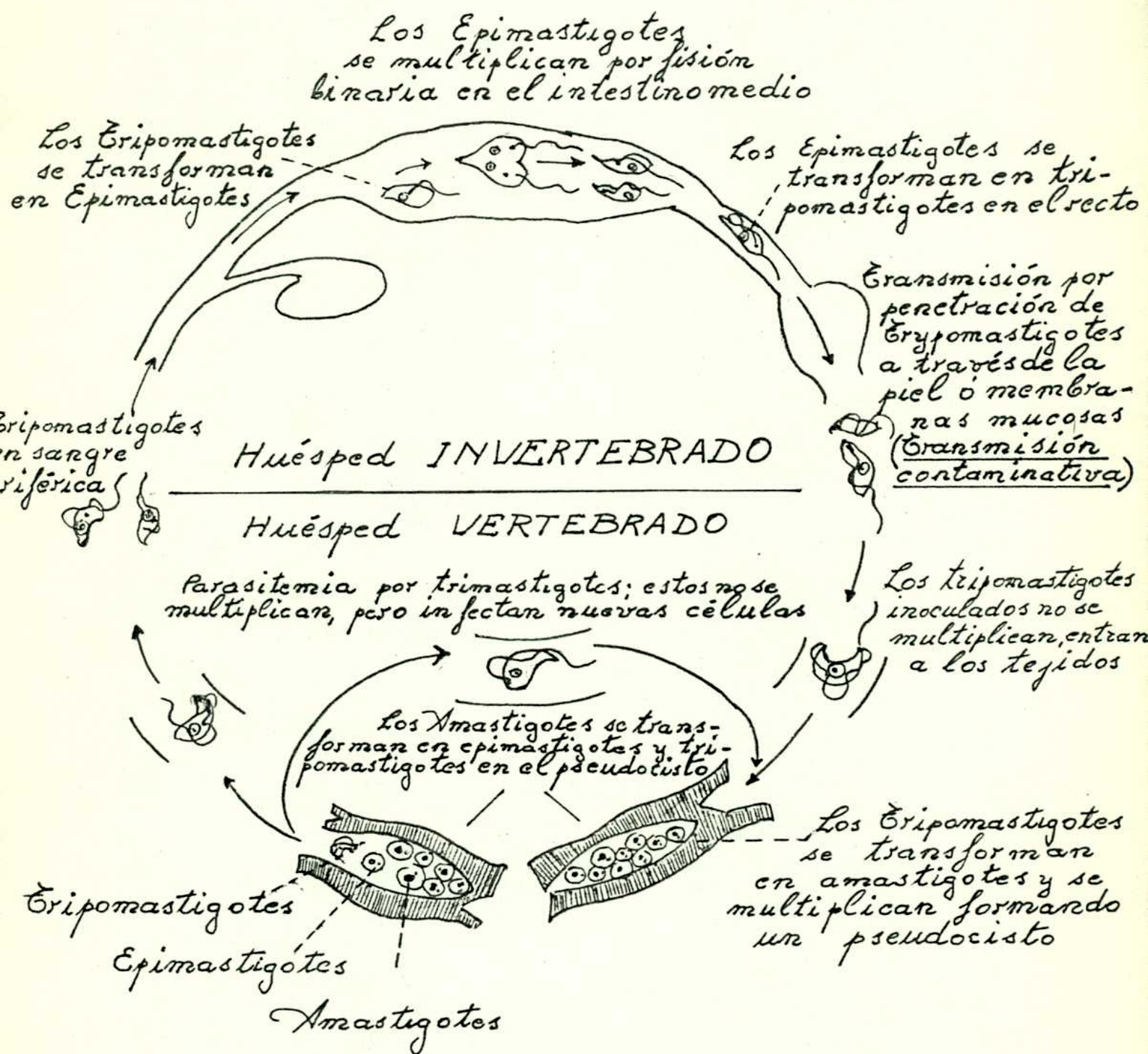
Especie: Trypanosoma cruzi

El género Trypanosoma puede ser dividido en 2 grandes grupos, uno de los cuales es el grupo Stercoraria. En él, la multipli-- cación en el huésped mamífero es discontinua, usualmente sólo tie-- ne lugar en una de las formas del ciclo de vida. Los organismos se desarrollan en el tracto posterior del triatomídeo (recto o intes-- tino posterior) y la transmisión es contaminativa. Este grupo tie--

ne 3 subgéneros, uno de los cuales es el subgénero Schizotrypanum, que incluye la especie cruzi, el agente etiológico de la Enfermedad de Chagas; de ahí la nomenclatura Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi.

Fig. 2: Ciclo de vida del

Erypanosoma cruzi



4. Vectores

El vector natural de T. cruzi como se mencionó anteriormente, es un insecto hematófago obligado que pertenece al género de los Triatomídeos. Es conocido vulgarmente como "vinchuca" en todos los países de América de habla hispana, como "barbeiro" en Brasil y como "kissingbug" en el suroeste de Estados Unidos. Habita climas relativamente cálidos y secos, entre el paralelo 42 en el hemisferio norte hasta el 43 en el hemisferio sur.

Se conocen más de 100 especies de Hemípteros, del género Triatómideo que pueden estar infectados con T. cruzi. Son de origen selvático y su grado de adaptación a las viviendas humanas es variable. Los más importantes transmisores pertenecen a los géneros: -- Triatoma, Panstrongylus y Rhodnius, con aproximadamente 10 especies cada uno.

Ciertas especies como Triatoma infestans y Rhodnius prolixus presentan un buen grado de adaptación, incluso la primera de estas se encuentra sólo raramente en ambientes salvajes. Constituyen los vectores más importantes en la transmisión de la Enfermedad de Chagas.

Estas especies varían de una zona geográfica a otra, siendo Triatoma infestans el principal vector en Bolivia, Chile, Paraguay Argentina y ciertas áreas de Brasil y Perú.

El Triatoma dimidiata, Triatoma sordida y Panstrongylus megistus son en su mayoría de localización selvática, pero están en un proceso de adaptación al ciclo doméstico (7).

Los Triatomídeos domésticos son insectos de 2 a 3 cm. de longitud, de hábitos nocturnos, de vuelo limitado debido a sus alas cortas. Anidan en los techos, detrás de los cuadros, etc. y por la noche descienden para alimentarse tomando la sangre de los vertebrados. Los huevos y las ninfas están cubiertas de polvo que las ocultan de los predadores.

C. Signos Clínicos

1. Fase Aguda

Pocas horas después de la penetración en el tejido conectivo del huésped, los parásitos estimulan una reacción inflamatoria en el sitio de entrada llamada "chagoma". Es una lesión nodular dentro de la piel, dura, roja, con edema intersticial marcado y que raramente se ulcera; y que permanece de 2 a 3 semanas. Se puede localizar en cualquier parte del cuerpo, siendo la cara el sitio más habitual. Cuando el lugar de entrada es la conjuntiva, el paciente desarrolla un edema periorbital unilateral, conjuntivitis y linfadenitis preauricular conocido como "signo de Romana".

El chagoma se caracteriza por el infiltrado de células, casi exclusivamente mononucleares, y parasitismo intracelular de los macrófagos tisulares. Los nódulos linfoides que drenan el sitio aumentan de tamaño y esto es considerado como inflamación inespecífica. Esta fase comienza además, con una reacción febril que no excede los 40°C, dolor de cabeza y cansancio. La fiebre puede ser intermitente o continua y usualmente persiste 4 a 5 semanas. Puede ocurrir diarrea y vómitos. Rápidamente después de la formación de este complejo primario, aún durante la primera o segunda semana de infección, los parásitos penetran en la corriente sanguínea produciendo un estado septicémico con metástasis hematogénica.

Cualquier clase de célula puede ser parasitada, pero los tripomastigotes tienen preferencia por las células de músculo cardíaco, pero también invaden músculo liso y esquelético, células de la glia y células del Sistema Retículo Endotelial (SRE). Así, existen diferencias entre las cepas, según su habilidad para invadir determinados sistemas de órganos, los extremos de este espec-

tro están representados por las cepas reticulotrópicas y miotrópicas, usualmente la primera es más virulenta. De esta forma, abandonan la corriente circulatoria, perforando la pared capilar y luego la membrana plasmática de la célula huésped, entrando por su extremo posterior (opuesto al flagelo libre). Meyer y col. 1958 (8) informó sobre la existencia de una vesícula, en dicho extremo posterior que contendría enzimas, las cuales facilitarían la entrada del parásito a la célula.

Una vez que los tripomastigotes penetran en la célula, se transforman en amastigotes los cuales se multiplican por división binaria durante un período de 5 días dentro de una cavidad llamada "pseudocisto o quiste intracelular". Los parásitos intracelulares parecen no estimular reacciones inflamatorias, y por estudios de inmunofluorescencia se demostró que sus constituyentes antigénicos están contenidos dentro del pseudocisto (2). Nuevamente, se produce la transformación a tripomastigote que muy raramente ocurre en forma simultánea. Tan pronto como el primer tripomastigote abandona el pseudocisto por su polo no flagelado, cesa la transformación de amastigote a tripomastigote por entrada de fluido intersticial, el quiste se desintegra y se liberan los tripomastigotes a la corriente circulatoria, para infectar otras células. Los amastigotes no transformados quedan en la vecindad del quiste roto, se desintegran y esa liberación de antígeno extracelular produce lesiones inflamatorias locales, dando lugar a un infiltrado masivo de neutrófilos y eosinófilos; cuando la reacción progresa hay un incremento gradual de monocitos, linfocitos y células plasmáticas, luego aparecen histiocitos, que se transforman en células epiteliales y puede haber degeneración grosera de fibras cardíacas (8) Frecuentemente se observa linfadenopatías y una moderada esplenomegalia. No obstante, los disturbios cardiovasculares, constituyen

la secuela más común; los cuales incluyen taquicardia, aumento --- transitorio del tamaño del corazón por aumento temporario de fluí- do dentro del saco pericárdico y ocasionalmente una alteración car- díaca.

En el caso de muerte en esta fase, es debida usualmente a en- cefalitis o miocarditis. Un 10% de los pacientes muere a los pocos días pero la mayoría sobrevive sin mayores dificultades; cuanto - más joven es el paciente, más grave será el pronóstico. Sin embar- go, con excepción de niños muy pequeños, la mayoría de los infecta- dos sobreviven a la fase aguda.

2. Fase Latente

En esta fase el paciente es asintomático, pareciendo un indi- viduo normal y sano. Sin embargo, el bajo nivel de parasitemia per- siste, lo cual se evidencia por un xenodiagnóstico positivo, indi- cando una multiplicación intracelular continua del parásito en los órganos y tejidos del huésped. Puede persistir años, por el resto de su vida o progresar en una fase crónica de la enfermedad. Nunca se observó una eliminación espontánea total del parásito (2).

3. Fase Crónica

Esta fase aparece usualmente diez o veinte años después de -- la infección inicial, en un porcentaje que se estima en alrededor del 10% de los individuos infectados. Involucra miocarditis progre- siva y/o dilatación irreversible de las vísceras huecas (esófago y colon).

La lesión cardíaca está caracterizada por infiltración con -- células mononucleares, destrucción de miofibrillas, y fibrosis in- tersticial, y es acompañada por agregación perivascular y a veces

intersticial, de células plasmáticas; normalmente está involucrado el tejido conductor.

Es muy difícil demostrar la presencia de parásitos en los tejidos en esta fase.

Ha sido sugerido (8) que la disfunción de los órganos mencionados (corazón, esófago, colon) es debida a la destrucción de células ganglionares asociadas a los músculos de estos órganos.

Las anormalidades en el corazón aparecen sólo cuando el 20% de las neuronas son destruidas, sin embargo el esófago debe tener más del 80% de destrucción para presentar alguna anormalidad.

En el caso de los órganos del tracto digestivo, las alteraciones en la movilidad son denominadas "aperistalsis" (8 , 9) y -- las consecuencias morfológicas de estos disturbios se conocen con el nombre de "enteromegalia", siendo el megacolon y megaesófago -- las más frecuentes. La definición general de "mega" (del griego mega: ancho) significa la dilatación permanente de las vísceras -- huecas acompañadas o no, por un engrosamiento y acortamiento de la pared. Este fenómeno es muy raro en Europa, y frecuente en Sud América. En Brasil, y debido a la alta frecuencia de casos encontrados, los autores tienden a admitir la existencia de una relación -- causa efecto, ya que salvo raras excepciones, los "megas" son de etiología chagásica (9).

D. Respuesta Inmune a parásitos

Las infecciones parasitarias constituyen el mayor riesgo para la salud del hombre, especialmente en la zona del trópico y subtrópico. Relativamente pocos son los protozoos que infectan al hombre (menos de 20), pero entre ellos se encuentran cuatro de los más importantes en cuanto al número de individuos afectados y la severidad de la enfermedad: malaria, tripanosomas Africano y Americano y las Leishmanias.

Existen dos razones principales por las que el estudio de la inmunidad a infecciones parasitarias se hace muy difícil. La primera de ellas es que los parásitos representan un complejo mosaico antigénico. Su ciclo de vida consiste usualmente de varias formas morfológicamente diferentes las cuales llevan posiblemente distintas estructuras antigénicas, pudiendo estar presentes simultánea o secuencialmente en el mismo huésped. Además el organismo representa un estímulo antigénico no sólo por antígenos somáticos sino también por la secreción o excreción de sustancias al medio. La segunda, sería que el rasgo importante de muchas de estas enfermedades es la persistencia del organismo en el huésped; ésto es logrado por la penetración en el interior de las células, permitiendo el escape de los mecanismos inmunes efectores; en algunos casos se ha demostrado otro camino, el de modulación de antígenos de superficie, el cual permite la persistencia dentro del huésped(10,11) y podría explicar la cronicidad en ciertas enfermedades parasitarias. Otras vías serían el pegado de antígenos de superficie (no ha sido demostrado en infecciones con protozoarios), inducción de inmunosupresión y quizás la liberación de antígenos bloqueadores. (12).

El hecho de que los parásitos evadan los mecanismos inmunes efectores, potencialmente letales del huésped, constituye uno de los problemas básicos de la inmunoprofilaxis.

Debido a que los mecanismos estratégicos son desarrollados - con tanta eficacia, es muy difícil, casi excepcional, encontrar - en las infecciones parasitarias evidencia clínica de inmunidad - adquirida.-

Así, las respuestas clínicas ante infecciones parasitarias se pueden dividir en 3 categorías: ('13)

1º) Ausencia de respuesta inmune efectiva

individuos que pueden llevar los parásitos en forma continua, con signos progresivos de debilitamiento de la enfermedad.

2º) Inmunidad no esterilizante

inducen respuesta inmune, que produce resistencia ante un desafío específico pero está asociado con persistencia del parásito en -- cantidades relativamente bajas.

3º) Inmunidad esterilizante

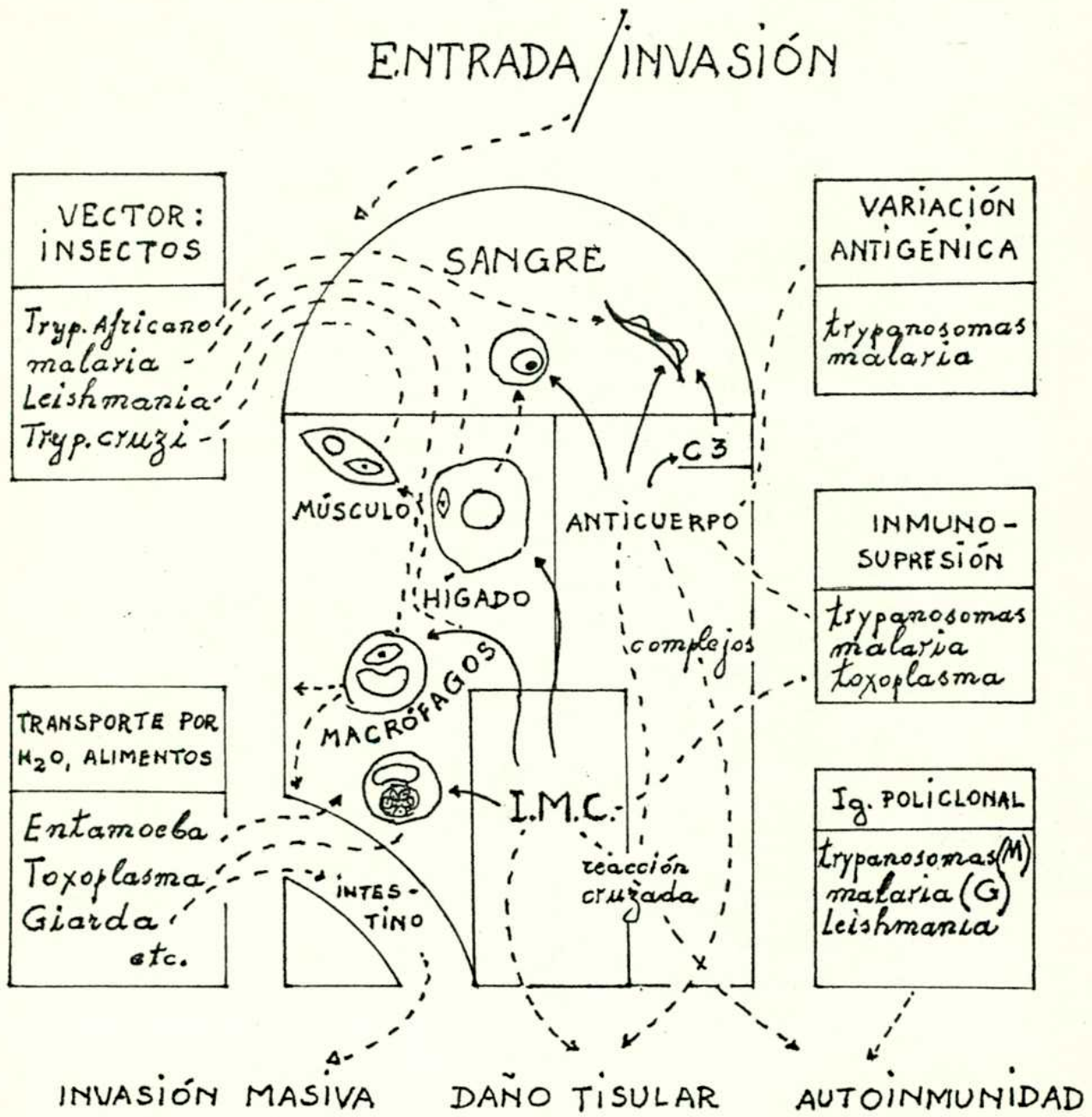
cura clínica, eliminación completa del parásito y resistencia específica por períodos grandes todo a lo largo de la vida a un desafío.

Existen varios caminos por los cuales una respuesta inmune - puede afectar los organismos invasores; estos se pueden dividir - en:

a) Mediado por factores humorales, comprende los efectos atribuibles a anticuerpos y/o otros componentes séricos: esencialmente - lisis y modulación antigénica. A pesar de que en la mayoría de -- los casos el parásito permanece en cantidades bajas en el huésped lo cual lo haría pobremente inmunogénico, se han demostrado anticuerpos por una variedad de métodos en todas las infecciones adecuadamente estudiadas. Si bien la detección de los mismos ha sido útil en el diagnóstico clínico y estudios epidemiológicos en general se correlacionan pobremente con el estado inmune clínico. Esto indica que el anticuerpo formado en respuesta a infecciones parasitarias no tiene efecto protectorio, sin embargo muchos son los investigadores que han logrado por medio de transferencia pasiva

de inmunidad un eficaz grado de protección. b) Mediado por células incluye mecanismos efectores que involucran la acción citotóxica - directa de linfocitos y activación de macrófagos. c) Involucra a-- aquellas situaciones donde ambos factores cooperan.

Fig. 3 : Inmunidad a Protozoos



E. Respuesta Inmune en la Enfermedad de Chagas

1. Respuesta Humoral

El papel que representa la inmunidad humoral es muy controvertido; debido a que se han obtenido una serie de datos insuficientes y con fusos.

Han sido detectados anticuerpos anti T.cruzi en pacientes o animales que sufren la enfermedad, y en individuos que han sido expues--tos a T.cruzi pero que carecen de los síntomas clínicos. Fueron de--tectados por técnicas de inmunofluorescencia directa o indirecta, a glutinación, hemaglutinación y fijación de complemento (14). - El primer anticuerpo que aparece es de la clase IGM y puede ser de--tectado tempranamente (4º día). Luego aparecen anticuerpos de tipo IGG que persisten durante toda la enfermedad (15). Sin embargo, no existe evidencia directa del efecto protector de los anticuer--pos.

Ha sido demostrado (12) que el suero de ratas inmunes a la infección con T.lewisi aumentó la fagocitosis in vitro del pará--sito.

No se encontró correlación entre el nivel de anticuerpos fija--dores de complemento y el estado de resistencia adquirida contra la infección producida por T.cruzi (16).

Por otro lado, la transferencia pasiva de suero inmune ha pro--ducido resultados contradictorios. Así, fue demostrado que el suero de animales convalecientes de fase aguda de una infección chagásica transferido a animales normales de la misma especie, les confirió - protección, evidenciada por menor parasitemia y disminución de la - mortalidad. Esto fue hecho en ratones (17 ,18) y en ratas (19,20). Sin embargo, otros investigadores fueron incapaces de demostrar el efecto protector de suero inmune administrado en forma pasiva (12). Se destacó la importancia del título del suero utilizado -

en los experimentos de transferencia, ya que mientras el suero de 6 semanas post-infección era eficaz en transferir protección, el suero de 12 semanas tenía mucho menos eficacia. (18). También -- cuando se investigó la acción in vitro de suero inmune específico -- sobre formas sanguíneas de 2 cepas de T.cruzi (Y y CL), se observó aglutinación de los parásitos y disminución de infectividad con parásitos de la cepa "Y" incubados con suero inmune, sin embargo, -- dicho efecto no se observó con los de la cepa "CL", lo que les sugiere diferencias en los receptores de membrana para el anticuerpo. Además la transferencia inmune pasiva lograda, ocurrió sólo cuando los ratones fueron desafiados con parásitos de la cepa "Y".(17) esto nos indica que el tipo de cepa utilizado en los experimentos -- de transferencia es muy importante.

2. Respuesta Celular

Fue demostrado tiempo atrás el histotropismo de T.cruzi, su estrecha asociación con células del sistema reticuloendotelial, y el rol de macrófagos en la ingestión y destrucción del parásito. Los estudios in vivo datan del año 1955 en que Taliaferro y Pizzi (24) realizaron un cuidadoso estudio para elucidar el comportamiento de T.cruzi de virulencia variable en ratones normales e inmunes. Observaron que los parásitos de la cepa avirulenta eran ingeridos y muertos por los macrófagos normales e inmunes; mientras que -- los parásitos de la cepa virulenta crecían libremente en macrófagos normales pero cesaba su crecimiento y eventualmente eran destruidos por macrófagos inmunes.

La inmunidad celular ha sido demostrada por diversas pruebas -- in vitro (22,23,25) y su papel en la resistencia del huésped se sugiere por lo siguiente:

a) El bloqueo del sistema reticuloendotelial con dióxido de torio -- coloidal (26) o sílica (27) aumentó los índices de infección y parasitemia, y el grado de mortalidad.

b) La timectomía neonatal en ratones inoculados con T.cruzi produjo alta parasitemia y una mayor mortalidad en relación con los controles. (21); también se encontró una alta densidad de parásitos en sangre y tejidos y una alta mortalidad en ratas timectomizadas - (28). Similares resultados se obtuvieron en ratas que recibieron suero antitimocito.

c) Se demostró un aumento de la infección en ratones inmunosuprimidos con radiación x, con ciclofosfamida y corticoides (29,30,31).

d) Existe evidencia que las reacciones de hipersensibilidad mediadas por células pueden encontrarse en pacientes y animales que padecen la enfermedad. Se ha demostrado reacciones de hipersensibilidad retardada a extractos de T.cruzi in vivo en el hombre (22)

y en animales (32). Esto se correlaciona con reacciones in vitro. Se demostró inhibición de la migración de macrófagos peritoneales de ratones infectados con T.cruzi frente a antígeno de T.cruzi (23), inhibición de migración de macrófagos-monocitos en pacientes chagásicos crónicos (25) y transformación blástica (22). También usando la técnica de inhibición de migración de macrófagos, se realizó un estudio cinético de aparición, en ratones infectados con tripo o epimastigotes. A los 60 días apareció una reacción significativa en el caso de infectados con formas tripomastigote y 150 días en el caso de infectados con formas epimastigote y depende aparentemente del número de formas infectantes inoculadas (33).

Existe como vimos, evidencia de la inmunidad celular en la Enfermedad de Chagas, pero no se demostró fehacientemente su rol protector.

Hanson y Roberson lograron transferir en forma pasiva, resistencia en ratas endocriadas, por medio de células de bazo de ratas que sobrevivieron a la fase aguda (34). No se sabe si la transferencia opera a través de la inmunidad mediada por células o simplemente

te por transferencia de células productoras de anticuerpo.

Fue estudiado el mecanismo de entrada del parásito al macrófago, así como la modificación de su función durante su infección (35 - 40). Se observó que a pesar de la actividad lítica de la célula, muchos parásitos escapan a su acción, sobreviviendo y perpetuando la infección, ya que se hacen inaccesibles a los sistemas de destrucción inmune.

Todo esto indica que la infección es suprimida por mecanismos inmunes pero no indican su naturaleza. Sin embargo, el equilibrio entre el sistema de defensa del huésped y el parásito es tal que permite que se establezca la infección crónica y persistente. Durante esta fase en aquellos enfermos que desarrollan la miocarditis chagásica se plantea la hipótesis de que mecanismos "autoinmunes" desencadenados por la infección pueden ser los causantes de las lesiones. (41 - 43).

Las células T citotóxicas, células "killer" y los leucocitos PMN podrían colaborar en la eliminación de los parásitos circulantes o en reacciones de autoinmunidad al reaccionar en forma cruzada con órganos propios.

F. Citotoxicidad mediada por células

El término de citotoxicidad mediada por células se aplica a reacciones líticas que requieren la participación de células linfoides o no linfoides, pero en ausencia de complemento.

Como podemos ver en el Cuadro 1 encontramos dos grandes tipos de citotoxicidad: Intracelular y Extracelular. Dentro de éstas se encuentran a su vez diferentes mecanismos de acción que involucran tipos celulares diferentes.

En toda reacción citotóxica, existe una célula efectora o agresora que va a ejercer su efecto citotóxico sobre otra célula -- llamada agredida o blanco; la naturaleza de esta última puede ser de lo más variable, a saber: células tumorales, células infectadas con virus, parásitos, eritrocitos, siendo de origen animal o humano.

I. Citotoxicidad Extracelular

1. Células Inmunes

En 1960 Govaerts (44) estudió el efecto citotóxico de células linfoides del conducto torácico de perros sensibilizados -- por un aloinjerto de riñón, contra células de riñón en cultivo de tejido. Las células linfoides del receptor agregadas a las células de cultivo produjeron lisis dentro de las 24 a 48 horas. Las células linfoides de perros normales o perros que habían recibido una tercera parte del injerto no eran citotóxicas. Sin embargo, el suero del receptor aumentó fuertemente la citotoxicidad exhibida -- por las células linfoides en suero normal. La adición de complemento potenció el efecto citotóxico.

Posteriormente a estas observaciones, numerosos han sido los estudios (45) que demostraron que las células linfoides de individuos inmunizados con aloinjertos normales o tumorales ejercieron una actividad citotóxica in vitro contra células blanco que

llevaban los antígenos de transplante que habían sido los utilizados para sensibilizar al donante. Esta citotoxicidad es específica, depende del contacto estrecho entre las células reactantes y no necesita la adición de complemento. El agregado de anticuerpo dirigido contra las células blanco a la mezcla de reacción produjo inhibición y no aumento del efecto, lo cual corrobora que el anticuerpo no está involucrado en el proceso lítico.

Las células responsables son las células T específicamente sensibilizadas y su efecto es independiente de anticuerpo.

2. Células no inmunes

Se detallan a continuación diferentes tipos de células no inmunes o normales que en presencia o ausencia de anticuerpo específico contra la célula agredida ejercen su efecto citotóxico.

a. Células "Natural Killer" o "NK"

La citotoxicidad espontánea mediada por células llamadas "NK" "natural Killer" han sido descubierta pocos años atrás (46 , 47) y parece constituir un mecanismo efector antitumor potencialmente importante, ejercen su efecto en forma espontánea o natural en ausencia de anticuerpo específico.

Estas células tienen en su superficie receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G, carecen de inmunoglobulinas de superficie y receptores para componentes del complemento, y son células adherentes.

Si bien los primeros estudios indicaban que sólo actuaban sobre células de leucemia o linfomas de roedores, se ha demostrado que su rango de acción es más amplio, siendo susceptibles a la lisis por este tipo de células, diversas líneas tumorales humanas o de ratón in vivo e in vitro y células normales (macrófagos, células de médula ósea humana y de ratón, células de timo de ratón y células de timo estimuladas por fitohemaglutinina (PHA) (48)

CUADRO 1

TIPOS DE CITOTOXICIDAD

	CÉLULAS INMUNES	T
CITOTOXICIDAD EXTRACELULAR		"Natural Killer" "Killer"
	CÉLULAS NO INMUNES	PMN Monocitos y macró-- fagos.
CITOTOXICIDAD INTRACELULAR	CÉLULAS NO INMUNES	PMN Monocitos y macró-- fagos.

----- Cuadro 2 -----

TIPO DE CITOTOXICIDAD	CÉLULA EFECTORA	MECANISMO
	"NATURAL KILLER" ("NK")	- CITOTOXICIDAD NATURAL. C ESPONTÁNEA
	MONOCITOS Y MACRÓ- FAGOS	- CITOTOXICIDAD ESPECÍ- FICA E INESPECÍFICA
CITOTOXICIDAD EXTRACELULAR	CÉLULAS ASESINAS ("KILLER" "K")	- CITOTOXICIDAD ANTICUER- PO DEPENDIENTE (CAD)
	MONOCITOS, MACRÓ- FAGOS Y PMN	- CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR MITÓGENOS
	PMN	- CITOTOXICIDAD DEPENDEN- DIENTE DE ANTICUERPO - LIBERACIÓN DE AGENTES OXIDANTES - ENDOCITOSIS REVERSA

b. Monocitos y Macrófagos

Los monocitos y macrófagos pertenecen a la categoría de células denominadas "fagocitos mononucleares", los cuales juegan un importante rol en el sistema de defensa del huésped(49) Los monocitos son células de transición que residen en la circulación por espacio de 2 a 3 días y luego migran hacia los tejidos donde se convierten en macrófagos tisulares; estas células tienen vida media larga, alrededor de meses, bajo condiciones normales y constituyen la unidad funcional más importante dentro de este sistema de células mononucleares. Dentro de los macrófagos tisulares podemos distinguir, los macrófagos libres, que se encuentran en tejidos conectivos y cavidades serosas, y los macrófagos fijos a determinados órganos por ejemplo, el hígado(se denominan las células de Kupffer), bazo y nódulo linfoideo.(50) Los macrófagos tienen dos características típicas in vitro: 1) - se adhieren a superficies de vidrio o plástico, aún con tripsina o agentes quelantes 2) generalmente no se dividen en cultivo (51). Ha sido investigado con gran detalle en los últimos años el rol de los macrófagos en la inmunidad mediada por células, -- tanto como células colaboradoras en el montaje de la respuesta inmune como en la fase efectora de la misma. En este sentido es importante destacar que existen 2 tipos de citotoxicidad en la cual participan los macrófagos (45) a) Citotoxicidad específica de "Macrófagos Armados". b) Citotoxicidad inespecífica de "Macrófagos Activos"

a) Citotoxicidad específica

Si los macrófagos normales son incubados in vitro con células linfoideas inmunes o sus sobrenadantes que han tenido contacto previo con el antígeno, se observa que estos macrófagos se hacen específicamente citotóxicos.

Aparentemente su superficie parece estar equipada con anticuerpos citofílicos o factores citofílicos producidos por células T inmunes.

b) Citotoxicidad inespecífica

Cuando los macrófagos "armados" son incubados con las células blanco específicas se activan y ejercen su efecto citotóxico contra distintas células, en forma por lo tanto inespecífica.

También los macrófagos pueden ser activados in vitro por varios agentes como endotoxina, poli I-C y RNA de doble cadena aislado de virus fúngicos o in vivo por infecciones crónicas con protozoos, infecciones bacterianas intracelulares o inyección con adyuvante de Freund.

c. Linfocitos "killer" (Asesinos)

Aunque en realidad no se sabe con certeza cuál es la línea original de los linfocitos "killer" (células K), morfológicamente se asemejan a un linfocito pequeño. Estos carecen de marcadores específicos de células T o B maduras, por lo que sería interesante ver si representan estadios tempranos de la diferenciación de las células mieloides o linfoides, o pertenecen a un tipo celular totalmente distinto.

Se las definió como las células efectoras en la reacción de citotoxicidad anticuerpo dependiente (CAD). Una de las características más importantes, es la presencia en su superficie de receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina G. El trabajo pionero en este tipo de citotoxicidad fue realizado por Perlmann y Col. y Mac Lennan y col. (52, 54) utilizando sistemas xenogéneos y alogéneos. El mecanismo exacto de la reacción aún hoy se desconoce, pero básicamente los linfocitos "killer" de una población linfoidea normal son capaces de destruir o lisis una gran variedad de células blanco en presencia de anticuerpo es

pecífico, o sea dirigido contra la célula agredida, (Ver Figura 6).

La mayoría de los autores han usado combinaciones heterogéneas -- de células blanco, anticuerpo y células linfoideas de diferentes especies: glóbulos rojos de pollo (55), monocapas de fibroblastos de oveja, anticuerpo de conejo, y linfocitos humanos (56) o células Chang de hígado (una línea celular humana), anticuerpo de conejo y linfocitos de ratón(57) o de conejo (58). La cantidad de anticuerpo requerida para la citotoxicidad mediada por este tipo de células, es muy inferior a la que se necesita en una reacción de lisis dependiente de complemento. -- Así, diluciones tan elevadas como $1/10^7$ fueron suficientes para inducir una lisis significativa de las células agredidas en presencia de linfocitos normales (45).

El anticuerpo capaz de inducir la reacción citotóxica es una inmunoglobulina de la clase IgG (53,54,45); las inmunoglobulinas IgM e IgA no han sido efectivas en este sistema (55,59, 60) A su vez, de la IgG se requiere el fragmento Fc ya que no ha sido posible inducir CAD con fragmentos Fab, Fab2 o anticuerpos tratados con 2-mercaptoetanol (54,53,61,62. En cuanto a la subclase de IgG involucrada en el proceso, estudios de inhibición usando IgG de mieloma de diferentes subclases humanas de IgG, demostraron -- que la reacción de CAD podía ser inhibida por IgG1, IgG2 y IgG3 y muy poco por IgG4. La mayor inhibición se produjo con IgG1 e IgG3 (63).

Con respecto a las subclases de IgG en sistemas animales se sabe muy poco, aunque se ha podido inducir CAD con IgG1 e IgG2 de cobayo (64). Estos mismos autores encontraron una correlación estadísticamente significativa entre afinidad y eficiencia en la CAD, por lo tanto los anticuerpos de alta afinidad presentaron mejores condiciones para interactuar con la célula efectora.

El bloqueo del receptor Fc con complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) o con IgG normal o agregada por el calor, produjo una in-

hibición de la reacción citotóxica(53,59,65-67). También fue inhibida por aloantisueros anti-linfocitos B (68), por factor reumatoide (FR) (61,69) y con proteína A de Staphylococcus aureus (69)

Para que ocurriera la lisis las células efectoras tenían que estar vivas y metabólicamente activas. El contacto entre las células efectoras y las células blanco era un prerrequisito para que ocurriera la lisis (52 , 59). Luego el contacto era seguido por una activación de las células linfoides, dependiente de energía, ya que se observó formación de urópodos y una aumentada movilidad (62). Los inhibidores de la respiración celular ej. actinomicina A y oligomicina, inhibieron la citotoxicidad. No se observó inhibición con inhibidores de la síntesis proteica, ADN o ATPasa - Na-K dependiente (70,71). Sobre la síntesis proteica, se señaló -- (74) que la misma, no era necesaria para que se iniciara la reacción de CAD, pero que la capacidad lítica de las células efectoras no se expresaba plenamente en presencia de un inhibidor específico como la cicloheximida, siendo esta parcial inhibición, dependiente de la dosis. Alterando los niveles de cAMP y cGMP se modulaba la CAD; así una elevación en los niveles de cAMP era acompañada por una reducción de la citotoxicidad, sin embargo un aumento en los niveles de cGMP llevaban a un aumento de la misma. Se demostró inhibición de la CAD mediante el uso de citocalasina B (53, 70). La remoción de iones Ca^{++} y Mg^{++} del medio, redujo el -- grado de lisis.

La reacción es altamente específica, así, cuando se incubaron mezclas de células blanco sensibilizadas con el anticuerpo y células blanco sin anticuerpo, junto con las células efectoras, no se observó lisis de las células no recubiertas con el anticuerpo llamadas "células inocentes" ("bystanders"). Este hecho permite la exclusión de una participación de factores tóxicos que hayan difundido durante la reacción , por lo menos a largo alcance (55, 72)

La reacción de CAD puede ser evaluada por tres métodos diferentes:

1°) Liberación de ^{51}Cr 2°) Prueba de microcitotoxicidad 3°) Ensayo de placa. En general, el más usado es el método de liberación de ^{51}Cr , debido a su alta sensibilidad, permitiendo la detección del isótopo liberado de las células blanco ya a una hora del contacto celular. La salida del isótopo aumenta linealmente en función del tiempo (73).

d. Linfocitos Killer, Monocitos, Macrófagos y Leucocitos PMN

Estos tipos celulares son capaces de inducir citotoxicidad mediada por mitógenos. Fue observado por primera vez por Holm y col. en 1964 (75), la destrucción inespecífica de células de cultivo de tejido por células linfoideas humanas o animales en presencia de fitohemaglutinina (PHA).

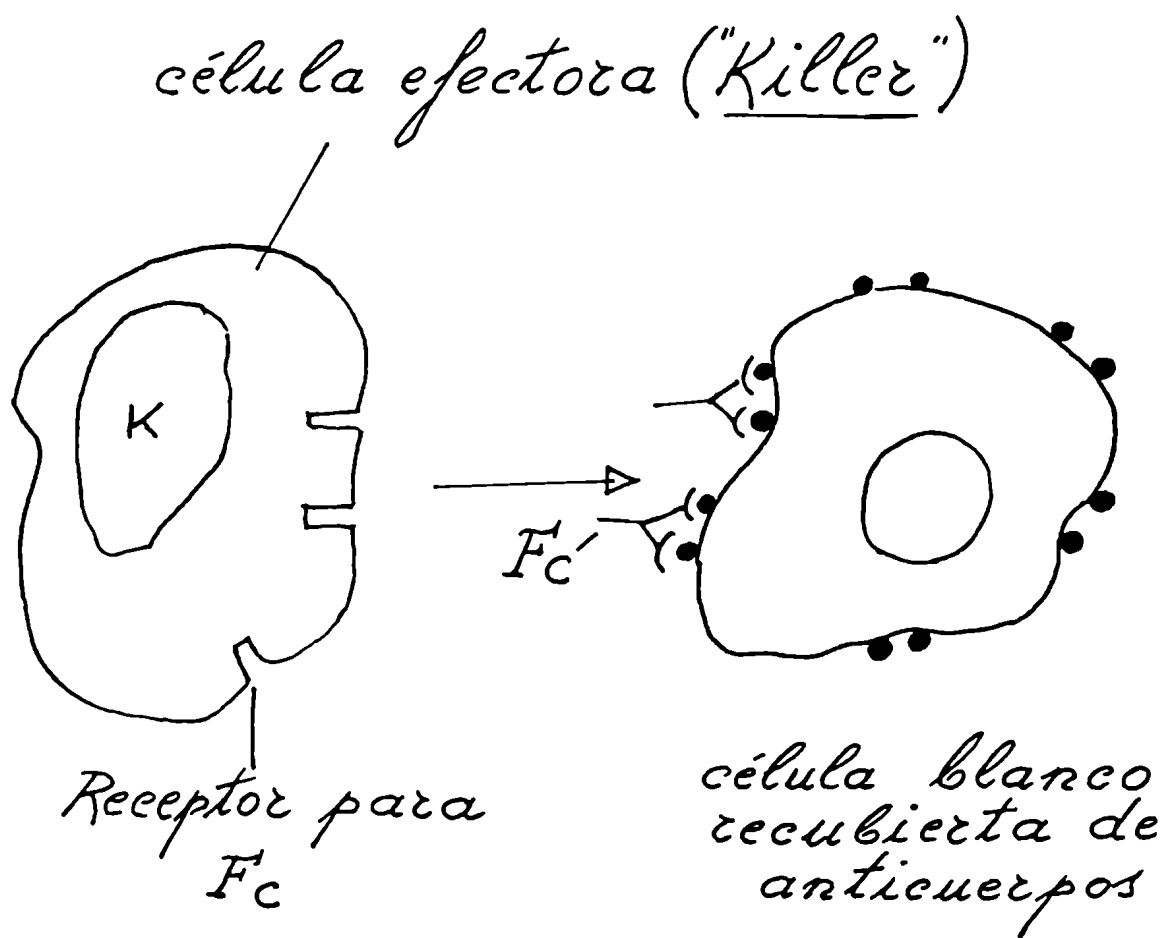
No existe relación de especificidad inmunológica entre los agentes estimulantes y los antígenos presentes en las células blanco, de allí su falta de especificidad. Son afectadas células blanco autólogas, singeneicas y alogeneicas.

Este tipo de citotoxicidad ha sido demostrada por diferentes mitógenos, además de la PHA, y por otros antígenos como PPD, globulina bovina y ovoalbúmina (76, 77, 52).

Ha sido demostrado ampliamente que la naturaleza de la célula blanco empleada, es de importancia crítica para definir la identidad de la célula efectora capaz de mediar la citólisis.

En el caso de emplear un sistema de leucocitos humanos, como células agresoras y eritrocitos de pollo como célula blanco, varios autores demostraron que las células efectoras eran adherentes y fagocíticas a diferencia de las células efectoras de la reacción citóxica anticuerpo dependiente (CAD) (78, 79).

Fig. 4 Citotoxicidad dependiente de Anticuerpo



e. Leucocitos Polimorfonucleares

Los leucocitos polimorfonucleares o granulocitos son células que permanecen en sangre periférica un corto tiempo (9-26 horas), luego migran a través de la pared de los vasos a los tejidos(ej. la piel y las membranas mucosas), donde sobreviven unos pocos días. En esos sitios pueden destruir diferentes microorganismos como bacterias, virus, protozoos y hongos. Son células fagocíticas por excelencia que poseen en su citoplasma gránulos que contienen sustancias que participan en la muerte y degradación de los agentes infecciosos constituyendo un mecanismo eficaz de destrucción intracelular. A esto nos referiremos más adelante con detalle. Los leucocitos PMN también son capaces de intervenir en reacciones de citotoxicidad extracelular a través de alguno de estos mecanismos:

- 1) Citotoxicidad Dependiente de Anticuerpo (CAD).
- 2) Endocitosis Reversa.
- 3) Liberación de Agentes Oxidantes.

1) Citotoxicidad Dependiente de Anticuerpo (CAD)

Como hemos mencionado anteriormente la célula efectora involucrada en la CAD (linfocito Killer) es una variedad de linfocitos que se caracteriza por la presencia en su superficie de receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina. Estos receptores no son propiedad exclusiva de estas células, sino que se ha demostrado su existencia en células no linfocíticas como macrófagos, monocitos y leucocitos PMN (80 - 87).

Se había observado que una contaminación del 5% de monocitos y neutrófilos en una población de linfocitos potenció y aceleró la lisis inicial de eritrocitos de pollo y de células Chang (58, 54) Se pensó que las células contaminantes tenían un efecto citotóxico en las primeras horas de la reacción de CAD ya que si se descartaban, la reacción no era alterada en su fase tardía.

Numerosos son los trabajos que demuestran que los leucocitos

PMN son responsables de la destrucción específica de diferentes células blanco. Es importante destacar que la CAD varía considerablemente con el sistema elegido. Así, aunque los PMN humanos son activos contra eritrocitos humanos y de pollo (79,76,88,89), son relativamente inactivos contra células Chang (79), células de mastocitoma murino (88, 90) y una línea celular humana linfoblastoide (91). Sin embargo, se ha demostrado la capacidad de matar células tumorales sensibilizadas con anticuerpo (El-4, LSTRA). El uso de diferentes tipos de preparaciones de anticuerpos podría explicar algunas diferencias en los estudios de citotoxicidad mediada por leucocitos PMN (79).

Los otros dos mecanismos de muerte extracelular que posee el leucocito PMN, son utilizados cuando está impedido físicamente de fagocitar, ya sea por fijación de la célula blanco a una superficie sólida o debido a una diferencia de tamaño entre ambos tipos de células que hace imposible la ingestión de la célula blanco.

2) Endocitosis Reversa

Es el mecanismo por el cual se libera al medio externo el material almacenado en los gránulos citoplasmáticos. Es también llamado "fagocitosis frustrada". Se observó que cuando los leucocitos se encuentran con complejos inmunes (solubles o insolubles) o gamaglobulina agregada, fijos a superficies sólidas, como filtros Millipore o membranas de colágeno, se fijan a estas superficies y liberan selectivamente sus gránulos lisosomales (92, 93). La liberación de enzimas bajo estas condiciones parece ocurrir por un proceso de endocitosis reversa, durante el cual se liberan las enzimas lisosomales directamente afuera de la célula, tal como sucedería en el interior de la vacuola fagocítica y la viabilidad de las células efectoras no es alterada. Este mecanismo es muy probable que ocurra en una variedad de enfermedades en las cuales se depositan complejos inmunes, sobre la superficie celular, ej. Lupus Eri

tematoso Sistémico (LES) (94).

La exocitosis o desgranulación, que sigue a la estimulación - de la superficie del PMN por reactivos inmunes, parece involucrar ambas clases de gránulos: azurófilos y específicos. Esto está comprobado por la detección en el medio que rodea a las células estimuladas de hidrolasas ácidas como β -glucuronidasa (proveniente de los gránulos azurófilos) y lisozima (proveniente de los gránulos - específicos) (92, 93).

Es importante destacar que algunos estímulos no inmunes provocan - descarga selectiva por exocitosis de los gránulos específicos; estos estímulos incluyen el forbolmiristato acetato, que es un promotor tumoral (95, 96), Concanavalina A (Con A) (97) y iones Ca^{++} (95, 98).

3) Liberación de Agentes Oxidantes

El leucocito puede liberar al medio productos microbicidas al tamente reactivos que resultan de la parcial reducción del oxígeno. La serie de eventos metabólicos que tienen lugar cuando los fagocitos son expuestos a un estímulo apropiado se conocen con el nombre de "Estallido respiratorio" (Burst respiratorio). Se puede dividir en 4 eventos separados, pero que dependen de un sistema enzimático único, ellos son: el aumento en la incorporación de oxígeno (O_2) (99), la producción de iones superóxido (100) y agua oxigenada (101) y por último un aumento de la oxidación de la glucosa a través de la vía de la hexosamonofosfato (99). El propósito de este proceso metabólico es proveer una batería de agentes oxidantes, que pueden ser usados por el fagocito en la destrucción de la célula blanco (célula tumoral, parásito, etc.). La identidad de la enzima responsable de la reacción del consumo primario de oxígeno durante el estallido respiratorio ha sido un problema durante años. Se está de acuerdo que la enzima que cataliza la reducción -

de oxígeno (O_2) a anión superóxido O_2^- es un nucleótido de piridina que se reduce. Hay gran discusión si es la NADH oxidasa o la NADPH oxidasa, la que dona los electrones; sin embargo se sugiere que la NADPH oxidasa es el agente fisiológico reductor (102).

El anión superóxido es un potente agente microbicida; gran parte de éste, 80%, es convertido en agua oxigenada o peróxido de hidrógeno, esta reacción puede ocurrir espontáneamente o ser catalizada por una enzima llamada superóxido dismutasa. Este puede reaccionar con aniones superóxido adicionales y formar radicales hidroxilo -- (OH^\bullet), esta es una de las especies oxidantes altamente inestables que reacciona casi simultáneamente con moléculas orgánicas que encuentra. En el contexto biológico es bien conocido como un producto mayor formado por el pasaje de radiación ionizante a través del agua y ha sido implicado en la toxicidad de tal radiación. Por lo tanto, esta sustancia que puede ser generada biológicamente, puede participar en la actividad microbicida⁽¹⁰³⁾. El peróxido de hidrógeno es particularmente importante y está en asociación con la mieloperoxidasa y iones haluro (104).

En 1967, Klebanoff⁽¹⁰⁵⁾ demostró claramente que la efectividad del H_2O_2 contra bacterias, hongos y virus, era ampliamente aumentada por la mieloperoxidasa y iones haluro (I^- , Br^- o Cl^-). La mieloperoxidasa es una hemoproteína de PM 150.000, que está presente en gránulos azurófilos de neutrófilos, pero está ausente en los eosinófilos, y cataliza la oxidación de iones haluro a hipohaluro por H_2O_2 . El sistema de la glutatión peroxidasa - glutatión reductasa y la catalasa citoplasmática le proveen al PM: de un medio para protegerse contra este compuesto altamente nocivo.

Es posible que también participe en el sistema oxidante de los PM: el oxígeno singlete que tiene la misma fórmula molecular que el oxígeno atmosférico pero difiere en la distribución de los electrones alrededor del núcleo. La nube electrónica cambia su configuración y esto modifica sus propiedades químicas. El carácter reacti

vo de este oxígeno es capaz de producir daño letal a sistemas biológicos con los cuales toma contacto.

Existen casos en los que los mecanismos de destrucción microbiana basados en la liberación de agentes oxidantes no funcionan normalmente, debido a un defecto ya sea, en la producción de H_2O_2 o una deficiencia en la mieloperoxidasa. En el primer caso, encontramos, la enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC) que es el ejemplo más claro de dificultad en la producción de H_2O_2 . Es una enfermedad hereditaria, que generalmente afecta al sexo masculino. Los niños con esta enfermedad sufren infecciones granulomatosas recurrentes en la piel, nódulo linfoideo, pulmón, huesos etc. y mueren antes de alcanzar los siete años de edad. El mayor defecto en estos pacientes es que los leucocitos no muestran el característico "estallido respiratorio" que acompaña a la fagocitosis; probablemente debido a la falta de NADH oxidasa en las células, por lo tanto, no producen H_2O_2 y les falta el sistema microbicida H_2O_2 - mieloperoxidasa - haluro.

Es de interés, que estos pacientes desarrollan serias infecciones con bacterias que producen catalasa (enzima capaz de destruir el H_2O_2) ej. Staphylococcus aureus, pero no con bacterias que son catalasa-negativas ej. pneumococci. Esto ocurre, porque estas últimas cometen una especie de suicidio, ya que producen suficiente H_2O_2 , necesaria para la maquinaria metabólica, la cual es utilizada así en la vacuola fagocítica, provocándole la muerte; en cambio la catalasa presente en el otro tipo de bacterias, destruye la pequeña cantidad de H_2O_2 producida, permitiendo la sobrevivencia de la bacteria, con perjuicio así del huésped (Figura 6) (106).

Otra enfermedad es la deficiencia en Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6FD), pero en estos casos los pacientes sólo presentan problemas significativos con infecciones. Si los niveles de G6FD son cercanos a cero.

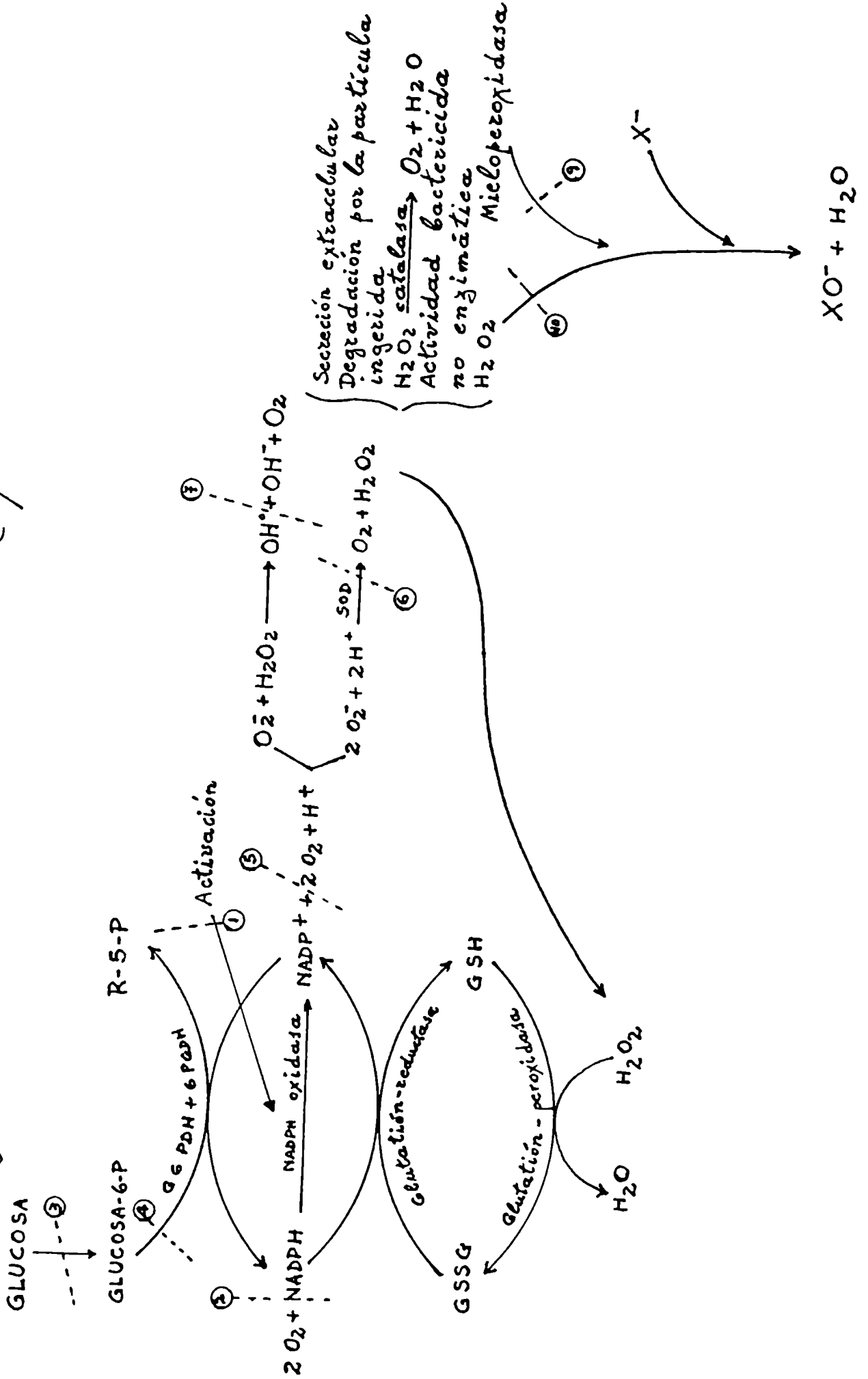
Ciertas drogas como la hidrocortisona y ciertas sulfonamidas, pueden interferir con la producción de H_2O_2 en leucocitos. Este me

canismo puede ser responsable de la predisposición a la infección encontrada en pacientes con una terapia de corticoides prolongada.

En el segundo caso, encontramos la deficiencia en mieloperoxidasa. Aunque muchas veces está asociada con infecciones recurrentes, tal defecto no produce usualmente trastornos en la salud del individuo.

La mieloperoxidasa coopera con H_2O_2 en la función microbicida pero también en la eliminación de H_2O_2 ; por lo tanto, la falta de ella lleva a una acumulación intracelular de H_2O_2 aumentada, que puede actuar directamente como agente microbicida.

Fig. 5: "Estallido Respiratorio"

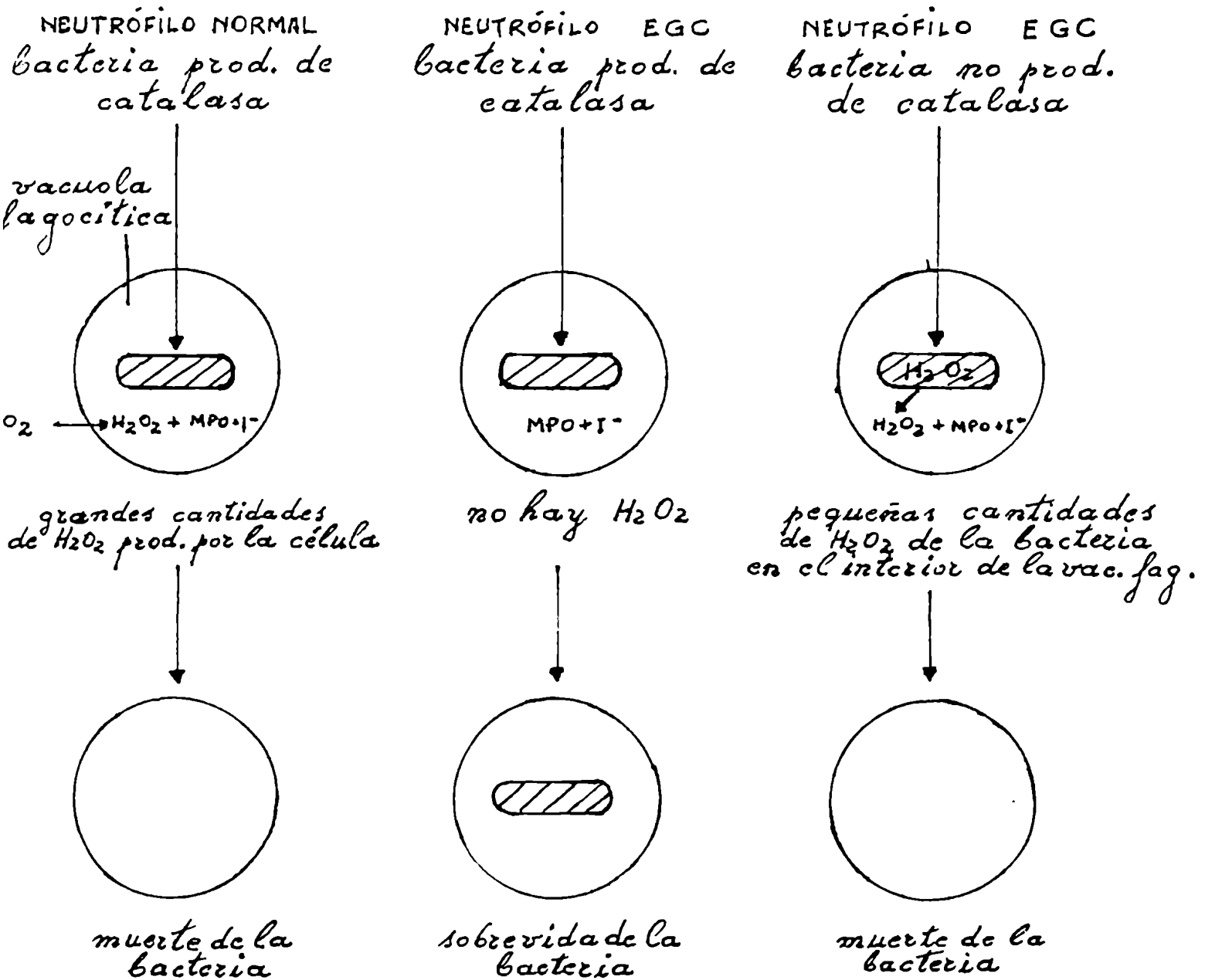


"ESTALLIDO RESPIRATORIO"

La línea de puntos indica que se puede bloquear con inhibidores es
pecíficos en esa zona, a saber:

- 1) Colchicina
Vincristina
- 2) Anaerobiosis
- 3) Glucosa
Deoxiglucosa
Iodoacetamida
- 4) Fenilbutazona
Amobarbital
- 5) Superóxido dismutasa (SOD)
Citocromo c
- 6) Cianuro (CN^-)
DETC
- 7) Iones hidroxilo (OH)
- 8) CN^-
- 9) CN^-
Azida
DETC
Sulfonamidas
- 10) Catalasa

Fig. 6: Enfermedad Granulomatosa Crónica



4. Diferentes clases de células blanco afectadas por los leucocitos - PMN en reacciones de citotoxicidad extracelular mediada por anticuerpo.-

a. Células Tumorales

Los leucocitos PMN se adhieren a células tumorales sensibilizadas y rápidamente inician la lisis, en ausencia de fagocitosis. La lisis es inmunológicamente específica ya que sólo las células tratadas con anticuerpo son destruidas.

Gale y col. (107) demostraron lisis de células tumorales EL-4, por leucocitos PMN humanos, en presencia de anticuerpo específico. Era independiente de complemento, de la síntesis proteica y de la replicación del ADN; el fenómeno era rápido, detectable a bajas relaciones PMN: célula tumoral y era inhibido por γ -agregada por el calor. Posteriormente, Zigelboim y col. (108) trabajando con este sistema, confirmaron los resultados y además observaron una disminución de la CAD por tratamiento con papaína o fosfolipasa C, y un aumento por tratamiento con neuraminidasa. Concluyeron que la CAD involucraría varios pasos, comenzando por una interacción anticuerpo-célula blanco, seguido por la adhesión de la célula efectora, a través del receptor Fc, lo cual dispararía la respuesta citotóxica, produciéndose finalmente la citólisis de la célula agredida.

Clark y col. (109) también demostraron que los leucocitos PMN humanos eran citotóxicos contra otra línea tumoral de mamífero (LSTRA) en presencia de Ac anti LSTRA. La acción citolítica se evaluó por liberación de ^{51}Cr de las células blanco. Los requerimientos fueron: presencia de Ac específico contra las células blanco, viabilidad, metabolismo oxidativo y glicólisis de las células efectoras; presencia de cationes divalentes y el sistema de microtúbulos intacto. Los constituyentes lisosomales, mieloperoxidasa y proteínas catiónicas parecen no estar involucradas, aunque los resultados no son claros en este sentido.

También los trabajos de Levy y col. (110) demostraron que los granulocitos humanos lisan células tumorales sensibilizadas con Ac y marcadas con ^{51}Cr : en este caso las células blanco fueron linfoblastos de la línea CEM. La CAD dependía de la temperatura y la cinética era rápida alcanzando niveles significativos a las 4 horas .

La reacción era claramente dependiente de Ac, ya que no involucró lisis de células blanco no sensibilizadas con Ac (llamadas "células inocentes"); estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros autores (109).

Hafeman y col. (111) trabajaron con leucocitos PMN humanos, adenocarcinoma mamario de rata, inducido por dimetil benzantraceno y Ac específico. Demostraron que el anión superóxido era esencial en la CAD mediada por PMN, y que la inhibición del "estallido respiratorio", limitando la cantidad de oxígeno o por el empleo de inhibidores del transporte de electrones, inhibieron la destrucción de las células tumorales. Inhibidores de la respiración mitocondrial (cianuro, azida) produjeron un aumento de la citotoxicidad. Por lo tanto, el requerimiento de oxígeno estaba más probablemente relacionado con la generación de aniones superóxido.

En todos estos casos la reacción era dependiente de la relación célula efectora a célula blanco y de la concentración de Ac.

De este modo estos experimentos in vitro, contra células tumorales, abren la posibilidad del rol in vivo de los leucocitos PMN en neoplasias. Así, Dvorak y col. (112) trabajando con un sistema in vivo, demostraron destrucción de células tumorales mediada por leucocitos PMN.

b. Células infectadas con virus

En 1976 Wardley y col. (113) demostró que los leucocitos - PMN bovinos ejercían CAD contra células infectadas con virus Herpes. La reacción no era afectada por drogas que inhibían la síntesis de ADN, ARN o proteínas. No ocurrió en ausencia de cationes divalentes, ni tratando los PMN con citocalasina B o sílica. Observaron que la CAD aumentó con sobrenadantes que contenían interferón inmune.

Oleske y col. (114) trabajando con PMN humanos, encontraron que estos eran citotóxicos contra células infectadas con virus Herpes simplex tipo I. La relación entre el número de células efectoras agregadas y el número de células blanco muertas mostró que la citólisis era consistente con la teoría del "one hit" (115) sugiriendo que la muerte de la célula blanco proviene de la interacción con una sola célula efectora. Se calculó que la frecuencia de células efectoras era del 3.5%.

Grewal y col. (116), compararon la efectividad de diferentes células efectoras en estimular la CAD contra células infectadas con virus Herpes.

El orden de efectividad fue el siguiente: PMN > Macrófagos > Granulocitos de sangre periférica > linfocitos de sangre periférica. Los PMN requirieron menos anticuerpo y destruían a las células blanco más rápido y más eficazmente. De ahí que estos autores plantearon que los PMN pueden ser el tipo celular más importante en la recuperación temprana de la infección herpética.

Siebens y col. (117) trabajando con células de pulmón embrionarias humanas infectadas con virus Herpes simplex (VHS) y neutrófilos humanos, demostraron que éstos inducían CAD en presencia de suero inmune anti-VHS, no así en ausencia de suero o en presencia de suero no inmune. Las células de pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica eran efectivas, al igual que las normales, -

lo que indica que aparentemente la lisis de células infectadas con virus era independiente del metabolismo oxidativo del PMN.

Rouse y col. (118) trabajando con 2 poblaciones de leucocitos bovinos contra células de riñón bovino infectadas con el virus de la rinotraqueitis bovina, sensibilizadas y marcadas con ^{51}Cr observaron que la responsable de inducir CAD era una célula adherente, ya que el tratamiento con limaduras de hierro (Carbonyl iron) abolió completamente la actividad de los leucocitos, ya sea de sangre periférica o de glándula mamaria. No determinaron si la célula efectora era un neutrófilo o un fagocito mononuclear. Estos hallazgos, aunque preliminares, sugieren que la CAD podría jugar un papel in vivo en el control de infecciones virales.

c. Eritrocitos

Holm y col. 1972 (119) demostró que los eritrocitos humanos, tratados previamente con tripsina 1% para hacerlos más lábiles marcados con ^{51}Cr y sensibilizados con isoantisueros calentados, contra antígenos A, E o Rh, eran lisados por leucocitos o macrófagos peritoneales humanos.

En un trabajo reciente de Katz y col. (120), se estudió la CAD de células efectoras de individuos normales y de pacientes con enfermedad Granulomatosa Crónica contra eritrocitos humanos. Cuando las células agredidas estaban en suspensión, los neutrófilos de los pacientes presentaban una disminución de la CAD, pero si las células agredidas estaban en monocapas, lo cual impedía la fagocitosis, el grado de lisis alcanzado por los neutrófilos de pacientes era igual al de los normales. La muerte extracelular no parecía depender de la generación de H_2O_2 , ya que es normal en las células de los pacientes.

También se observaron reacciones de citotoxicidad dependiente de anticuerpo contra eritrocitos de diferentes especies animales.

Rouse y col. (118) trabajaron con 2 poblaciones de leucocitos bovinos: de glándula mamaria y de sangre periférica, contra eritrocitos de pollo sensibilizados y marcados con ^{51}Cr . La primera población estaba compuesta por 65% de células fagocíticas mononucleares (monocitos y macrófagos) y la 2ª población estaba formada por 80% de linfocitos, 19% de monocitos y sólo 1% de neutrófilos. Observaron que ambas poblaciones eran capaces de desarrollar una reacción de CAD contra eritrocitos xenogéneos en presencia de Ac. específico.

d. Parásitos

David y col. (121) demostraron que los eosinófilos humanos eran capaces de inducir una reacción de citotoxicidad dependiente de anticuerpo contra schistosomas de Schistosoma mansoni marcadas con ^{51}Cr y sensibilizadas con suero de pacientes con Schistosomiasis. La reacción requirió energía derivada de la glicólisis, probablemente estén involucradas las esterasas asociadas a la célula y estaría modulada por nucleótidos cíclicos. Era inhibida por citocalasina B. Butterworth y col. (122) trataron de explicar la preferencia de los eosinófilos, en comparación con los neutrófilos para adherirse a schistosomas sensibilizadas con Ac. Dicen que era una función dependiente de la temperatura, que hace que el pegado del eosinófilo sea estable e irreversible.

En cuanto a protozoarios, los trabajos existentes no permiten discernir si la citotoxicidad observada fue intra o extracelular. Serán discutidos más adelante, junto con nuestros resultados.

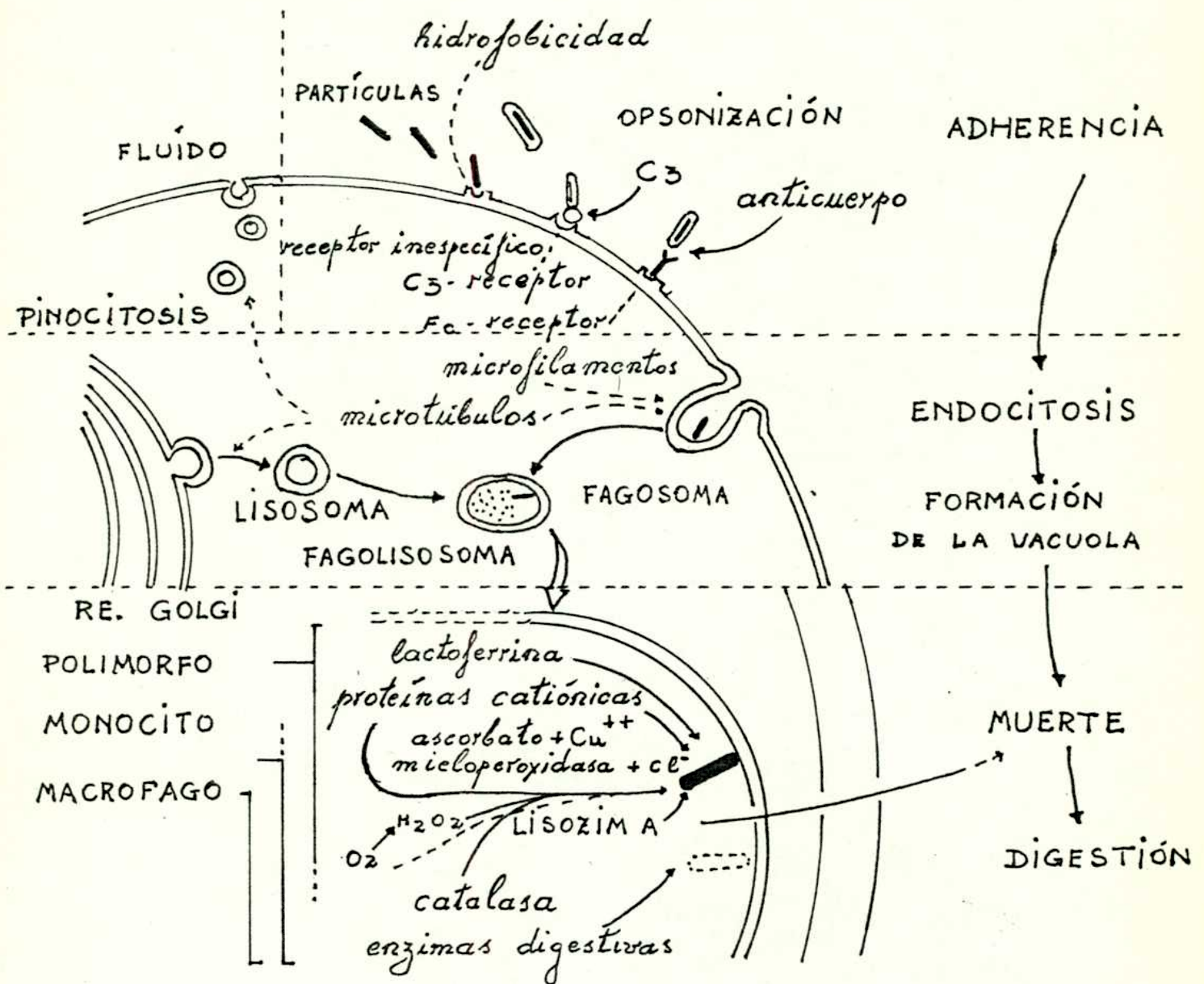
II. Citotoxicidad Intracelular

Para que una célula efectora pueda ejercer un efecto citotóxico intracelular contra una determinada célula blanco, obviamente es necesario que esta última sea incorporada en su interior. El proceso que involucra la ingestión se denomina "Fagocitosis" (Ver figura 7). Este es uno de los más importantes mecanismos de defensa del huésped. Existen dos grandes categorías de células que participan en el proceso: los fagocitos PMN (granulocitos) y los fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos), ambos se originan en la médula ósea pero pertenecen a diferentes líneas celulares.

Uno de los requerimientos iniciales de la fagocitosis, es el contacto entre la célula fagocítica y la partícula u organismo a fagocitar. Este contacto tiene lugar in vivo, por el transporte a través de la sangre o linfa, hacia los sitios donde se encuentran las células fagocíticas fijas (o sea los macrófagos tisulares) o por la migración de células fagocíticas móviles (granulocitos y monocitos) al sitio donde se encuentra la partícula u organismo a fagocitar. En el primer caso, los macrófagos de hígado, bazo y nódulos linfoides limpian por endocitosis la sangre y linfa de microorganismos, complejos inmunes, etc., y en el 2º caso, la acumulación de fagocitos en el sitio de lesión los hace participar de una reacción inflamatoria por ingestión de los distintos microorganismos.

La fagocitosis es fuertemente influenciada por ciertas características de la célula blanco. En particular, la ingestión es dependiente de las propiedades de superficie de la misma pueden influir profundamente las variaciones en hidrofobicidad y cargas de superficie del material a ingerir. No existe ninguna regla aparente sobre propiedades de superficie óptimas (93). Sin embargo, se sabe, que la tarea del granulocito se ve facilitada por el proceso de opsonización. De allí, que separaremos al proceso en los siguientes pasos: opsonización de las partículas por factores del suero, el pe

Fig. 7 : Fagocitosis



gado de ellas a la superficie celular, englobamiento de esas partículas, muerte intracelular y digestión del material ingerido.

Las sustancias que actúan como opsoninas son componentes del suero, inmunoglobulinas: IgG e IgM y el factor C3 del complemento(123), ya que los granulocitos y fagocitos mononucleares tienen receptores en su membrana celular para el fragmento Fc de la IgG y para el fragmento C3b del componente C3 del complemento (81,84, 85). Así, el factor C3b, generado por clivaje proteolítico del componente C3 del complemento, y que resulta de la activación de la vía clásica o alternativa o de la acción directa de proteasas (plasmina o tripsina), se adhiere firmemente a la célula agredida. Ha sido demostrado en granulocitos, monocitos y macrófagos normales que los receptores Fc en la membrana de la célula fagocítica inducen la adherencia e ingestión de partículas opsonizadas con IgG(82,84,85); en contraste, los receptores para C3b sólo promueven la adherencia pero no la ingestión. En macrófagos estimulados por ejemplo con tioglicolato (124), los receptores para complemento pueden estimular el pegado e ingestión de partículas opsonizadas con complemento. Las partículas adheridas, merced a estos receptores, a la célula fagocítica inducen la formación de pseudópodos en el fagocito, que rodean a la partícula, hasta que se encuentran, fusionan y forman la vacuola fagocítica o fagosoma primario. De aquí puede seguir 3 vías diferentes (Ver Figura 8), según el organismo que es fagocitado: la más habitual, es la fusión de los lisosomas con esta vacuola para formar un fagolisosoma o fagosoma secundario. Los lisosomas descargan su contenido, y comienza la muerte y degradación del organismo ingerido. Esta vía es seguida, entre otros, Toxoplasma, Chlamydia y Plasmodia (Ver Figura 8, c).

La segunda vía que puede seguir es cuando el organismo es capaz de lisis la membrana vacuolar y es liberado entonces en la matriz citoplasmática, ej. virus Vaccinia, Babesia, Trypanosomas. Por último,-

el organismo puede inhibir la fusión de la vacuola con los lisosomas de la célula, y replicarse en el interior de la misma, ej. Neovirus, Listeria, Mycobacteria y Leishmania (Ver Figura 8, b) (125).

Como se mencionó anteriormente, la descarga de los lisosomas va acompañada por una compleja actividad metabólica ("Estallido respiratorio"), que involucra la producción de agentes oxidantes que participan en la destrucción del organismo fagocitable (102).

Ambos tipos de células fagocíticas (PMN y mononucleares) poseen hidrolasas ácidas ej.: fosfatasa ácida, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, glucuronidasa y catepsina, capaces de digerir el material fagocitado. Los leucocitos PMN poseen sustancias bactericidas y además gránulos con enzimas, capaces de dañar los tejidos del huésped. Poseen dos tipos de gránulos: a) Específicos o secundarios que contienen lisozima (que hidroliza la pared celular de muchas bacterias) Fosfatasa alcalina, colagenasa, lactoferrina y una proteína que se une a la Vitamina B-12. b) Azurófilos o primarios los cuales además de poseer lisozima, tienen mieloperoxidasa, proteínas catiónicas bactericidas de bajo peso molecular (que pueden aumentar directamente la permeabilidad vascular o la liberación de histamina), hidrolasas ácidas como β -glucuronidasa y fosfatasa ácida, y proteasas neutras.

Con respecto a los receptores en la superficie de la célula fagocítica se ha propuesto (126) un modelo de fagocitosis llamado "del cierre relámpago" (zipper) en el cual éstos juegan un rol muy importante (Ver Figura 9). Proponen que la ingestión de la partícula adherida al fagocito, requiere la interacción secuencial de los receptores de membrana con los ligandos distribuidos en la superficie de la partícula, formando como un molde que guía a la membrana del fagocito.

En este modelo se propone que la interacción inicial ligando-receptor genera una señal que inicia la agregación de proteínas contractiles y lleva a la emisión de pseudópodos en el área de la partícula

Fig. 8 Diferentes vías de entrada al citoplasma celular

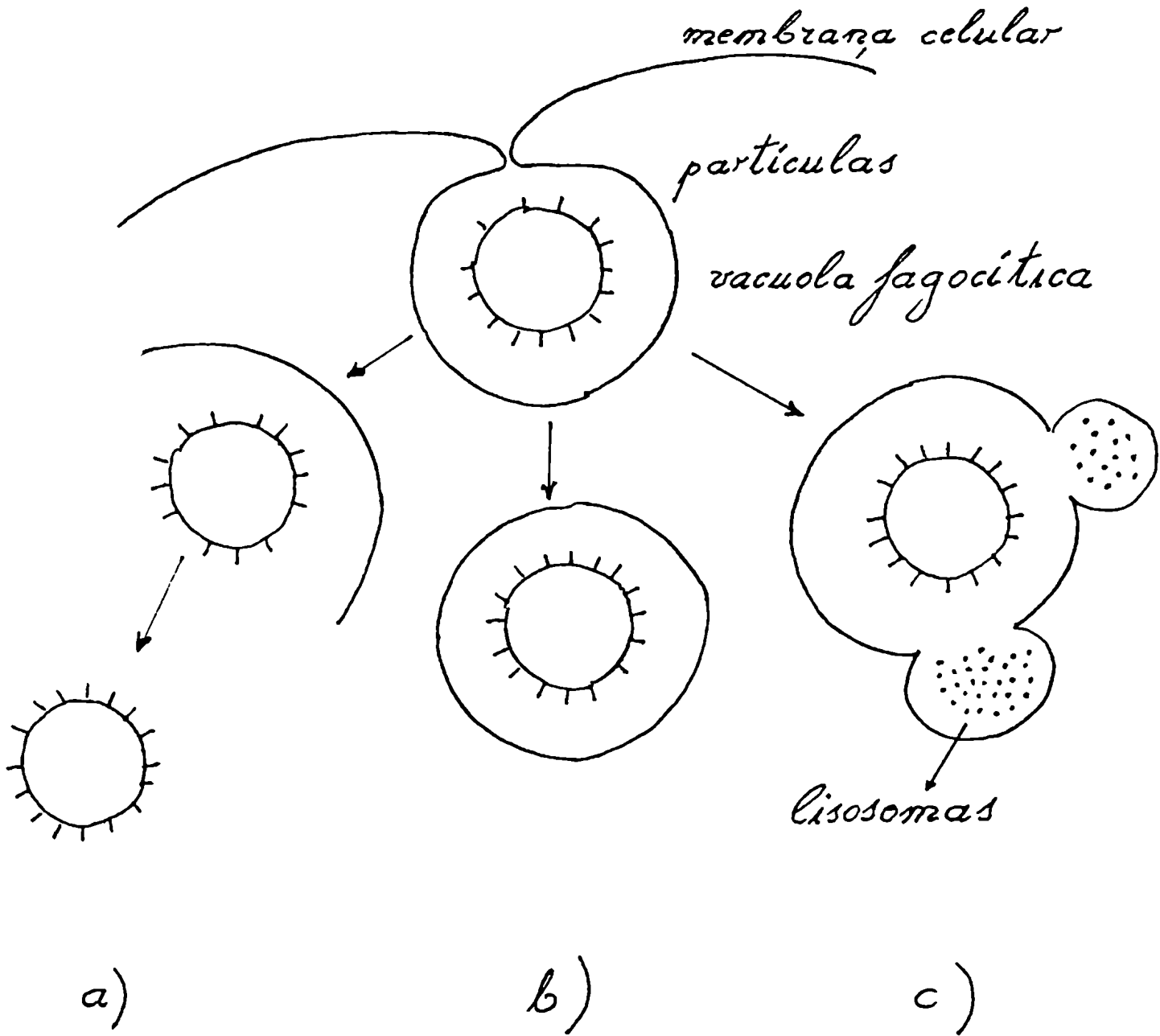
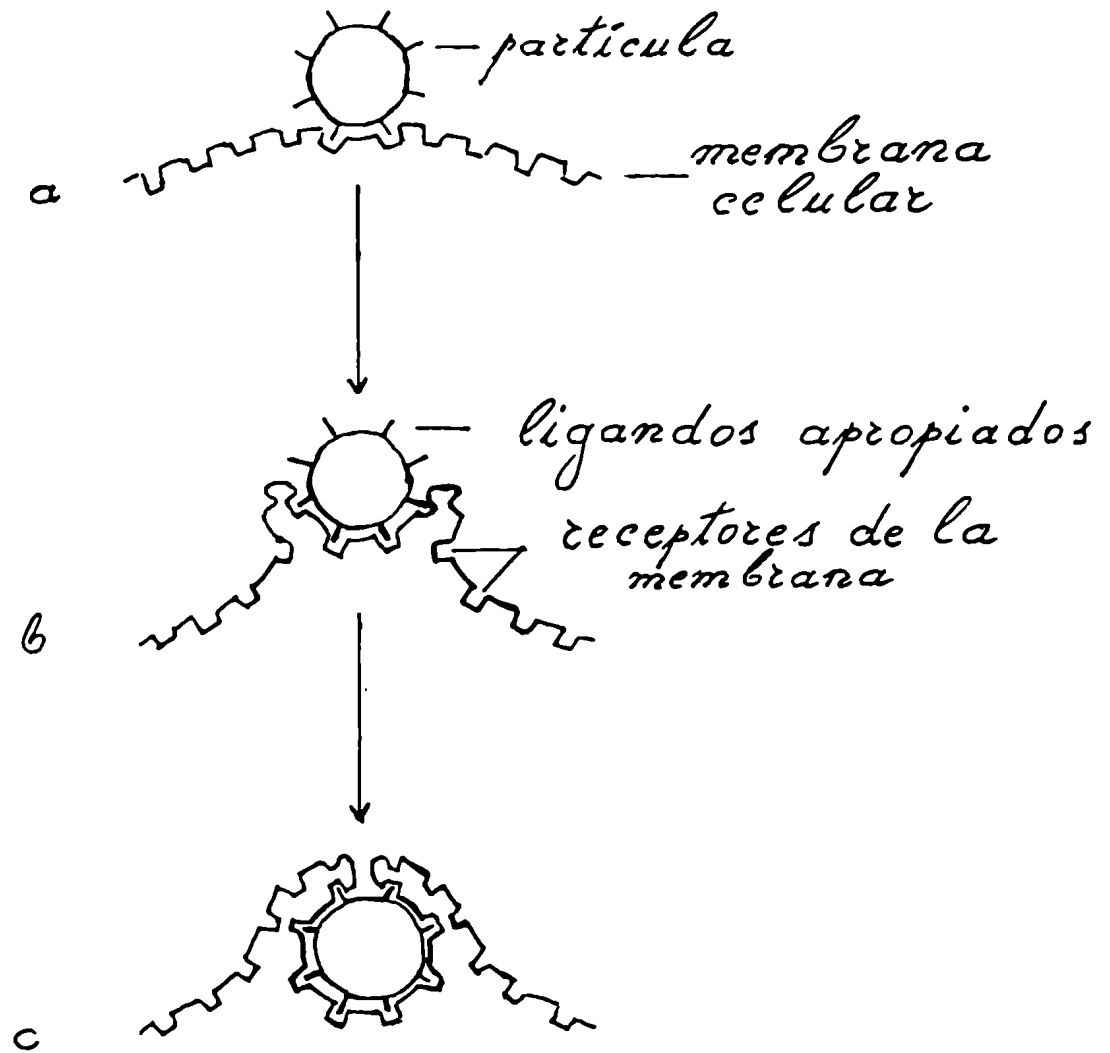


Fig. 9: Modelo del cierre relámpago
(Zipper)



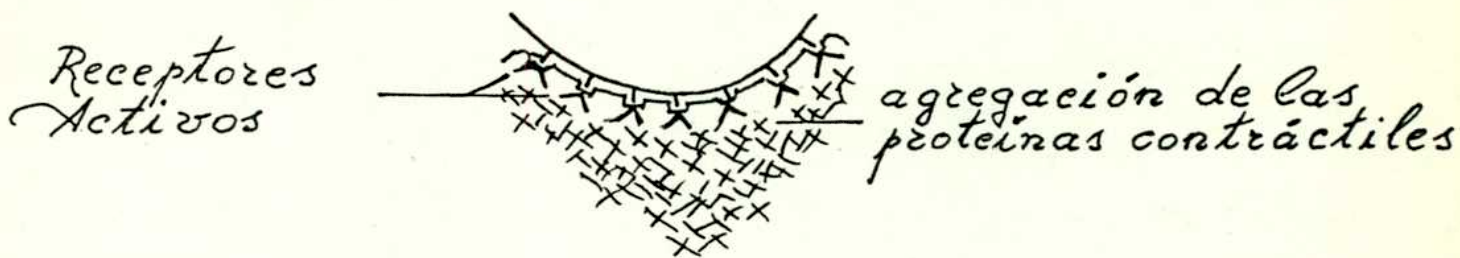
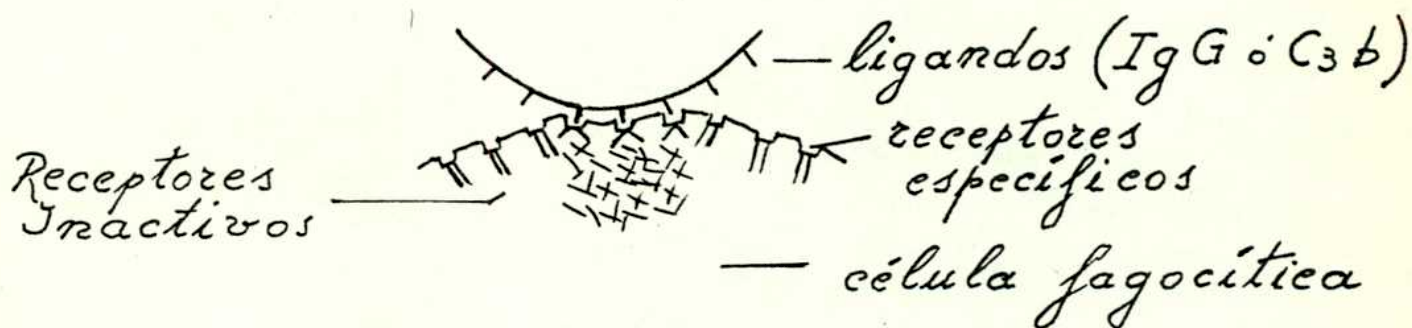
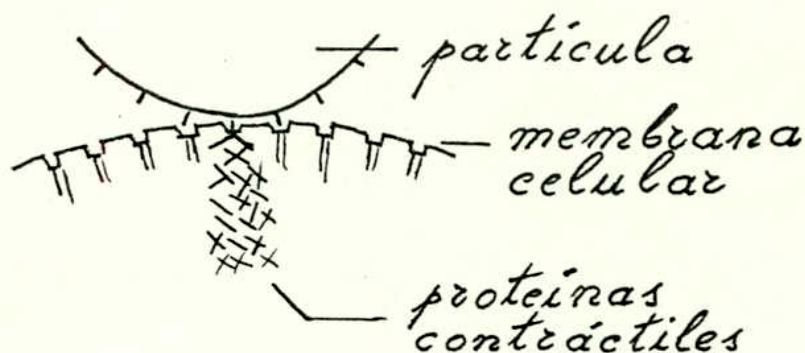
Los receptores en la membrana de estos pseudópodos, se unen a ligandos adicionales en la superficie de la partícula y esto genera a su vez señales nuevas, seguidas de la agregación de proteínas contráctiles citoplásmicas (Ver Figura 10) y posterior emisión de pseudópodos. Este proceso se repite muchas veces hasta que las membranas de los pseudópodos se encuentran, y fusionan para formar la vacuola fagocítica.

De acuerdo a esto, los elementos contráctiles citoplasmáticos proveen la fuerza motriz, y las interacciones de los receptores de membrana con los ligandos de la superficie de las partículas fagocitables proveen las señales que inician la polimerización local de estos elementos contráctiles y el molde sobre el cual se orientan sus movimientos.

Las proteínas contráctiles constituyen la estructura citoesquelética de la célula, formada por microfilamentos y microtúbulos. -- Los microtúbulos son fibras huecas de 20 nm de diámetro. Están formados por la proteína llamada "tubulina", las cuales se unen formando polímeros. Su número aumenta cuando estas células son expuestas a un estímulo de superficie. La colchicina, droga que produce disolución de los microtúbulos, inhibe la ingestión, quimiotaxis, adhesión a la superficie y desgranulación, demostrando su importancia en la fagocitosis. Los microfilamentos son más pequeños, 6 nm de diámetro, y parecen constituir el sistema contráctil. Son polímeros de actina y son numerosos en el área de la célula involucrada en la adhesión e ingestión. Este sistema puede ser inhibido, interfiriendo con la producción de energía metabólica (ATP). Usando citocalasina B, que es un metabolito fúngico, se logra una gran inhibición de los microfilamentos, esta droga es una potente inhibidora de la migración de los PMN y de la fagocitosis, por lo tanto es fundamental en el mecanismo de muerte intracelular (94).

Los leucocitos mono y polimorfonucleares son capaces de ejercer un efecto citotóxico intracelular en una amplia variedad de sistemas, constituyendo un importante mecanismo de defensa en muchas -

Fig. 10: Fagocitosis
polimerización de las proteínas
contráctiles



enfermedades infecciosas.

En el caso de la Tripanosomiasis, muchos han sido los autores que han descrito citotoxicidad contra este tipo de parásitos. Así, Baker y col. (127) estudiaron la adherencia y la penetración de Trypanosoma dionisii, in vitro, a macrófagos peritoneales de ratón. Este fenómeno ocurría, ya sea que los parásitos estuvieran vivos o muertos por el calor, y con macrófagos normales o de animales inmunizados. La entrada era inhibida por citocalasina B - pero ambas, entrada y adherencia eran inhibidos por tripsina. La penetración era casi completamente por fagocitosis, y no por penetración activa.

Williams y col. (128) estudiaron la entrada de parásitos de T. cruzi a macrófagos normales y activados y también a monocitos. Los macrófagos activados inhibían la multiplicación de T. cruzi, -- mientras que se multiplicaban normalmente en los macrófagos no activados. Sugiriendo que el control de los parásitos por macrófagos y monocitos activados sería muy importante.

Nogueira y col. (38) estudiaron la entrada de epi y tripomastigotes de T. cruzi a células cultivadas in vitro. Los organismos eran rodeados inicialmente por una membrana plasmática derivada del fagosoma. Los epimastigotes eran destruidos dentro del fagolisosoma mientras los tripomastigotes y formas de transición escapaban de la vacuola, y se multiplicaban en la matriz citoplasmática. El tratamiento de los macrófagos con tripsina y quimotripsina impedía el pegado y la ingestión, mientras que la citocalasina B - sólo inhibió la ingestión. Nogueira y col. (39) demostró que en los ratones infectados con T. cruzi y que recibieron un desafío intraperitoneal con tripanosomas muertos por calor, se observaba una estimulación de los macrófagos peritoneales, ya que in vitro desarrollaban una actividad tripanocida. También observaron (40) que se podía inducir actividad microbicida contra tripomastigotes de T. cruzi en macrófagos normales de ratón, por exposición a sobrenadantes de cultivos de células de bazo provenientes de ratones

infectados.

También se encontró (129) una fuerte correlación entre la capacidad intracelular de los macrófagos de matar a T.cruzi (formas epí y tripomastigote) y la liberación de H_2O_2 , lo cual implicaría que esos parásitos serían muertos por generación de este compuesto oxidante.

Sanderson y col. (130) realizaron un estudio morfológico - entre tripomastigotes de T.cruzi y eosinófilos, neutrófilos y macrófagos de rata in vitro.

Observaron que los macrófagos inducidos por dextrán, eran infectados, los parásitos se multiplicaban como amastigotes y eventualmente eran liberados al medio. Los eosinófilos mostraron una citotoxicidad dependiente de anticuerpo, mientras los neutrófilos también fagocitaron en ausencia de Ac, pero la reacción era significativamente mayor en su presencia. Los eosinófilos tenían la particularidad de liberar los amastigotes incompletamente destruidos al medio. Este fenómeno fue análogo al observado (131) utilizando una técnica de microcinematografía con glóbulos rojos como células blanco. El sistema utilizado consistió en células de rata (eosinófilos, -- neutrófilos, linfocitos Killer, mastocitos) contra eritrocitos de camero. El comportamiento de neutrófilos y eosinófilos era completamente diferente; los eosinófilos mostraron un rápido movimiento de membrana y repetidamente englobaban y regurgitaban los eritrocitos mientras los neutrófilos después de fagocitar quedaban en un estado de quiescencia hasta expulsar todo el resto celular, pero el isótopo era liberado rápidamente.

Vemos que la interacción de T.cruzi con macrófagos y también con -- granulocitos ha sido estudiada por distintos grupos de trabajo, apareciendo diferencias en los resultados, debido a las diferentes cepas utilizadas. Por lo tanto, es muy importante, determinar en -- las diferentes líneas de trabajo cual es la cepa usada, de lo contrario se hace muy difícil la comparación de los resultados.

Aunque no existen hasta ahora evidencias sobre el rol biológico de eosinófilos y neutrófilos en la infección de T.cruzi, pero teniendo en cuenta que en muchos casos, en los macrófagos se efectúa la -- multiplicación de los parásitos y que las células "Killer" parecen -- no tener efecto alguno sobre los parásitos sensibilizados con Ac específico, los granulocitos podrían jugar el rol principal en la destrucción del parásito, sobre todo en los estadios tempranos de la -- infección.

Hemos visto la importancia de los distintos tipos celulares en los mecanismos de destrucción intra y extracelular contra diferentes células blanco, incluyendo células tumorales, eritrocitos, células infectadas con virus y parásitos. Dado que el tema de esta tesis --- comprende el estudio de los mecanismos inmunes citotóxicos contra -- T.cruzi, parásito causante de la enfermedad de Chagas, hemos considerado desarrollar toda una metodología que nos permita evaluar la participación celular, en los mecanismos de destrucción del parásito y su posible relevancia en la defensa del huésped. Decidimos investigar fundamentalmente el rol de los leucocitos de sangre humana periférica en un sistema "in vitro" contra formas de cultivo del parásito, estudiando en forma detallada el mecanismo de lisis.

MATERIALES Y METODOS

A.1-a Células Blanco

Se utilizaron formas de cultivo (epimastigotes) de la cepa Tuluahuén del Trypanosoma cruzi. Las mismas, mantenidas a 28°C en un medio bifásico compuesto de agar más sangre⁽¹³²⁾, fueron transferidas a un medio bifásico carente de sangre por espacio de 24-48 horas, y finalmente a un medio monofásico también durante 24-48 horas

B. Marcaje de las células blanco

Un millón de parásitos eran inoculados en 2 ml de medio monofásico conteniendo 2 μ Ci de Uridina tritiada (actividad específica: - 29 Ci/mM, TMM-85B, CNEA Francia) e incubados a 28°C por un período de 5 a 12 días.

El día que se realizaba el experimento los epimastigotes marcados (Epi-³H) eran lavados tres veces con solución fisiológica pH 7.4, centrifugando 15 minutos cada vez, a 700 g, en una centrífuga International refrigerada RC-2. Finalmente eran suspendidos en 5 ml de Medio 199 Completo (Medio 199, Difco, Detroit, Mich., 5% de suero fetal bovino inactivado por calor, 10 mM de buffer Hepes y 100 Unidades/ml de penicilina y 100 μ gr/ml de estreptomina) y haciendo una dilución de 1/20 - 1/50, eran observados al microscopio óptico. Se colocaban en una cámara de Neubauer, efectuándose el conteo de las formas móviles. Luego se suspendían a la concentración requerida en Medio 199 Completo.

A.1-b Células Blanco

Se utilizaron formas de cultivo (epimastigotes) de la cepa Tuluahuén del Trypanosoma cruzi, mantenidas por pasajes semanales, en medio de Warren (3.7 gr% de Brain Heart Infusion, Difco; 2 mg% de hemina ovina purificada tipo II, Sigma y 4% de suero bovino inactivado por calor) a 28°C.

B. Marcaje de las células blanco

Se colocaron 10×10^6 parásitos de 7 días de cultivo en 5 ml de medio de Warren fresco conteniendo $2 \mu\text{Ci}$ de Uridina tritiada (actividad específica: 29 Ci/mM; TMM-85B, CMEA, Francia) y se incubaron 4 a 6 días a 28°C . Los epimastigotes marcados (Epi- ^3H) fueron lavados 3 veces con Medio 199 Completo centrifugando cada vez 5 minutos a 2500 rpm en una centrífuga Sorvall 55-4, no refrigerada. Posteriormente se suspendieron en 5 ml de Medio 199 Completo, se hizo una dilución 1/20 - 1/50, y se observaron en el microscopio óptico. Se contaron las formas móviles en una cámara de Neubauer. Se suspendieron en Medio 199 Completo a la concentración deseada.

C. Pretratamiento de las células blanco

Los parásitos fueron presensibilizados siguiendo los procedimientos a ó b, a saber:

a) Efectuado el recuento de las formas móviles, se suspendieron a una concentración de 5×10^6 /ml. Se incubaron volumen a volumen, durante 15 minutos a 28°C con el antisuero de conejo anti T.cruzi a una concentración final de 1/200. Luego de la incubación los epimastigotes marcados y sensibilizados con el anticuerpo específico (Epi- ^3H -anti TC) se lavaron 2 veces con el Medio 199 Completo, centrifugando durante 5 minutos cada vez, a 2500 rpm en una centrífuga Sorvall 55-4, no refrigerada.

Finalmente, los Epi- ^3H -anti TC se suspendieron en Medio 199 Completo a la concentración requerida en la reacción.

b) Efectuado el recuento de los parásitos móviles, se los suspendió a la concentración requerida en la reacción. Se distribuyó $100 \mu\text{l}$ de Epi- ^3H y $100 \mu\text{l}$ de antisuero anti TC (concentración final 1/200) en los tubos de reacción correspondientes, incubándose luego durante 15 minutos a 28°C . Es decir, que la sensibilización se efectuó directamente en los tubos de reacción.

D. Células Efectoras

1. Obtención de Leucocitos Periféricos Totales

Se extrajo sangre venosa de donantes normales utilizando como anticoagulante ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) al 2.5% (concentración final). Se diluyó al 1/2 con solución fisiológica adicionada de 10 mM de EDTA. Los leucocitos periféricos (LP) se obtuvieron por sedimentación durante 60 minutos a 37°C de 3 volúmenes de sangre diluida, con 1 volumen de Dextrán 6%. Los LP fueron lavados 3 veces con buffer de fosfatos de Na 0.1 M pH 7.0, centrifugando durante 10 minutos a 200 g en una centrífuga International RC-2, descartando el sobrenadante enriquecido en plaquetas. (Ver Recuento Celular).

2. Purificación de Leucocitos Periféricos Totales

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y mononucleares (LM) fueron purificados por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque (133). Esta mezcla se preparó mezclando 10 volúmenes de Ficoll 400 al 9% (Pharmacia, Uppsala, Suecia) con 24 volúmenes de Hypaque 34% (Winthrop); se controló que su densidad fuera de 1.074 gr/ml. La sangre venosa diluida se sembró cuidadosamente sobre esta mezcla en una relación 3:1 (sangre: mezcla Ficoll-Hypaque). Se centrifugó a temperatura ambiente durante 40 minutos a 400 g en una centrífuga International RC-2.

Los LM se obtuvieron de la interfase y se lavaron 3 veces con buffer de fosfatos de Na 0.1 M pH 7.0, centrifugando a 4°C durante 20 minutos a 500 rpm. A esta velocidad se descartó la mayoría de las plaquetas. Los PMN se obtuvieron del fondo del gradiente junto con los eritrocitos. Esta mezcla se diluyó al 1/2 con solución fisiológica adicionada de 10 mM de EDTA. A la misma se le agregó Dextrán 6% en una relación mezcla: Dextrán de 3:1, dejando sedimentar

los eritrocitos durante 60 minutos a 37°C. Se aspiró con cuidado el sobrenadante conteniendo los PMN, contaminados con una pequeña cantidad de eritrocitos. Fue lavado 3 veces con buffer de fosfatos de Na 0.1 M pH 7.0, centrifugando a 1000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Luego de estos 3 lavados, al precipitado se le agregó 4.5 ml de agua destilada, y se la dejó actuar, por espacio de 30-60 segundos a 4°C, posteriormente se restituyó la tonicidad con 0,5 ml. de solución salina concentrada, se le agregó también 30 ml de buffer de fosfatos y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante conteniendo los eritrocitos lisados. Posteriormente el precipitado conteniendo los PMN fue lavado otras 3 veces más con el mismo buffer, centrifugando a 500 rpm durante 15 min a 4°C, para eliminar las plaquetas. Se suspendieron en 5-10 ml de buffer, se realizó el recuento (Ver Recuento Celular) y se mantuvieron hasta su uso a 4°C, y en la misma solución a la concentración de células/ml a usar, para evitar su aglutinación. En el momento de la reacción se las suspendió en Medio 199 Completo.

3. Recuento Celular

El recuento celular se realizó diluyendo las suspensiones de células 1/20 en una solución conteniendo 10 mg de violeta de Genciana, 3.1 ml de ácido acético glacial y 50 ml de agua destilada (Solución de Turk). Se colocó una alícuota en una cámara de Neubauer y se realizó la lectura con un aumento de 400x, dividiendo a las células en 2 categorías: mononucleares (linfocitos y monocitos) y PMN (neutrófilos y eosinófilos.)

E. Antisueros

Se utilizaron antisueros de conejos inmunizados con homogenato total de epimastigotes de T.cruzi (134) o sueros de pacientes

con Enfermedad de Chagas Crónica. Fueron inactivados a 56°C 1 hora y luego, para evitar la interferencia de γ -globulina agregada o complejos inmunes durante la reacción, los sueros se centrifugaron a 60.000 g en una ultracentrífuga Spinco, modelo L2 durante 60 minutos. Los sueros control, suero humano o de conejo no inmune, fueron sujetos al mismo tratamiento.

Fue usado antisuero de diferentes conejos, los cuales dieron resultados similares.

F. Purificación parcial de γ -globulina del antisuero de conejo -

La γ -globulina de conejo se precipitó a partir de suero de conejo inmune o normal con 12% de $\text{SO}_4 \text{Na}_2$. Se lavó 3 veces con esta concentración salina, se suspendió en el menor volumen posible de agua destilada y se dializó finalmente contra solución salina buffereada. La concentración proteica final se ajustó a 15 mg/ml (135)

G. Purificación de los sueros de pacientes chagásicos crónicos y normales.

Se purificaron los sueros de pacientes chagásicos crónicos y sueros normales, por el método de centrifugación zonal o gradiente de densidad. Se obtuvieron así, a partir de suero total, las 2 fracciones, una correspondiente a la IgM y otra a la mezcla de IgG e IgA.

El procedimiento consistió en primer lugar, en la preparación de un gradiente de sacarosa en un tubo de centrifuga de material plástico; para ello, se sembró sucesivamente, 1.1 ml de cuatro diferentes concentraciones de sacarosa: 40%, 30%, 20% y 10%. Se lo dejó a 4°C, aproximadamente 6 horas. De este modo, la densidad del medio en el fondo del tubo es máxima y mínima en su parte superior. Se sembró, entonces, 0.25 ml de la muestra a separar, en la parte superior del gradiente, y se ultracentrifugó durante 12 horas a 4°C, a 30.000 rpm en un rotor SW 39 (la centrifugación del tubo se hace en

posición horizontal) en una centrífuga Spinco modelo L2.

Durante la centrifugación, las diferentes macromoléculas se ubicaron a través del gradiente, de acuerdo a su peso, densidad y forma provocando la aparición de bandas o zonas separadas.

Se procedió entonces a recoger las diferentes muestras mediante una separación cuidadosa del contenido del tubo, a través de una perforación practicada en el fondo del mismo. El número de fracciones - fue variable, dependiendo del tamaño de la punción, pero osciló alrededor de 18 tubos. Luego se procedió al análisis cuantitativo de cada una de ellas, por la técnica de inmunodifusión radial. Efectuada la lectura, se hicieron los pools correspondientes a la IgM y la mezcla de IgG e IgA. Se dializaron contra solución salina bufferada durante 48 horas. Se guardaron a -20°C .

H. Pruebas Serológicas

Los sueros de pacientes chagásicos crónicos fueron sujetos a las siguientes pruebas serológicas: hemaglutinación pasiva (136) fijación de complemento (137) e inmunofluorescencia (138). Para detectar el título de los anticuerpos aglutinantes anti T. cruzi se utilizó la técnica de Vattuone y Yanovsky (139), utilizando los reactivos de Polymetron (Bs As).

Los títulos se expresaron como la máxima dilución que aglutina a epimastigotes de T. cruzi tratados con tripsina y formol. Los títulos de aglutinación por encima de 1/32 fueron considerados positivos.

I. γ -globulina agregada

Se utilizó γ -globulina agregada, Fracción II de Cohn (Hemoderivado, Buenos Aires). Una solución de 24 mg/ml en solución fisiológica, se calentó durante 20 minutos a 63°C. y se conservó a 4°C.

J. Reacción Citotóxica

La reacción consistió en mezclar cantidades variables de células efectoras ($0.2 - 5 \times 10^6$) con Epi- ^3H ($4 \times 10^4 - 2.5 \times 10^5$) y una dilución 1/50 - 1/100 de suero inmune o control en un volumen de 0.4 ml de Medio 199 completo en tubos descartables de plástico 3,3 cm de altura x 1.0 cm de diámetro (Polystor, Bs As) o bien mezclando directamente las células efectoras con los Epi- ^3H previamente sensibilizados con el antisuero específico (Epi- $^3\text{H-Ac}$). Se agitaron y centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se incubaron a 28°C (15 min - 7 Horas). En algunos experimentos se omitió la centrifugación inicial (Tabla 5). Después de la incubación, se los resuspendió, y centrifugó nuevamente a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C, aspirándose el sobrenadante (0.1-0.2 ml) con una pipeta automática. En los casos en que se aspiró 0.2 ml del sobrenadante, este se transfirió a viales de centelleo y se disolvió agregando 50 ml de Tritón X-100 al 4%, 0.2 ml de ácido fórmico y 10 ml de solución centelleadora (4 gr de PPO, 0.2 gr de PCPOP, 700 ml de tolueno y 300 ml de alcohol etílico absoluto.)

Cuando se aspiró 0.1 ml de sobrenadante, se transfirió a un tubo de plástico descartable, 5,0 cm de altura x 1,2 cm de diámetro (Polystor, Bs As) y se disolvió agregando 3 ml de solución centelleadora de BRAY (100 ml de alcohol metílico, 60 gr de Naftaleno, 4 gr de PPO, 0.2 gr de PCPOP, 20 ml de Etilen-glicol y Dioxano cantidad suficiente para 1 litro).

Dicho tubo era colocado dentro de un vial de centelleo. En ambos casos la radioactividad liberada al sobrenadante se midió en un contador automático Beta, Packard 3320.

Se consideró como 100% de Uridina- ^3H liberada, la radioactividad de 0.1 - 0.2 ml del sobrenadante de un tubo que contenía $4 \times 10^4 - 2.5 \times 10^5$ Epi- ^3H y 100 ml de Tritón X-100 al 4% o 100 ml de dodecilsulfato de sodio (SDS) en un volumen final de 0.4 ml con Medio 199 - Completo.

La capacidad citotóxica de las células efectoras se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \text{Liberación del isótopo (\%)} \times 100$$

$$\frac{\text{cpm en 0.1-0.2 ml de sobrenadante de la reacción}}{\text{cpm en 0.1-0.2 ml de sobrenadante del control (SDS o Tritón X-100)}} \times 100$$

Posteriormente, y debido a ciertas dificultades en la obtención del 100% de lisis con Tritón X-100 al 4% o SDS, el porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \text{Liberación del isótopo (\%)} \times 100$$

$$\frac{\text{Radioactividad en 0.1 ml del sobrenadante}}{\text{Radioactividad Total/4}} \times 100$$

La radioactividad total corresponde a la radioactividad presente en un tubo conteniendo 0.1 ml de Epi-³H a la concentración requerida - en la reacción y suspendidos en Medio 199 Completo y 3 ml de solución centelladora de Bray.

K. Viabilidad de los leucocitos de sangre periférica.

Los LP (60×10^6) fueron marcados con 150 μCi de ⁵¹Cr (⁵¹Cr Na₂CrO₄; actividad específica 22.36 Ci/grCr) en 1 ml de Medio 199 Completo durante 1 hora, con agitación cada 10 minutos. Los LP marcados con ⁵¹Cr (LP-⁵¹Cr) se lavaron 3 veces con el mismo medio, se suspendieron a 20×10^6 /ml y se usaron en la reacción citotóxica contra epimastigotes de T. cruzi no marcados.

El porcentaje de ⁵¹Cr liberado se calculó comparando la radioactividad presente en 0.2 ml del sobrenadante de los LP-⁵¹Cr tratados con Tritón X-100 al 4%. Se hizo de acuerdo al siguiente cálculo:

$$\text{Liberación del isótopo (\%)} = \frac{\text{Radioactividad en 0.2 ml del sobrenadante}}{\text{Radioactividad Total/4}} \times 100$$

$$\frac{\text{cpm en 0.2 ml del sobrenadante de la reacción}}{\text{cpm en 0.2 ml del sobrenadante del control (Tritón X-100)}} \times 100$$

Las muestras se contaron en un contador Gama Packard 3320.

L. Reacción de Fagocitosis

Se mezclaron 100 μ l de parásitos pretratados previamente con el anticuerpo (4×10^4 Epi- ^3H -Ac) con 100 μ l de cantidades variables de células efectoras (PMN) a 0°C, y se llevaron a un volumen final, de 400 μ l con Medio 199 Completo.

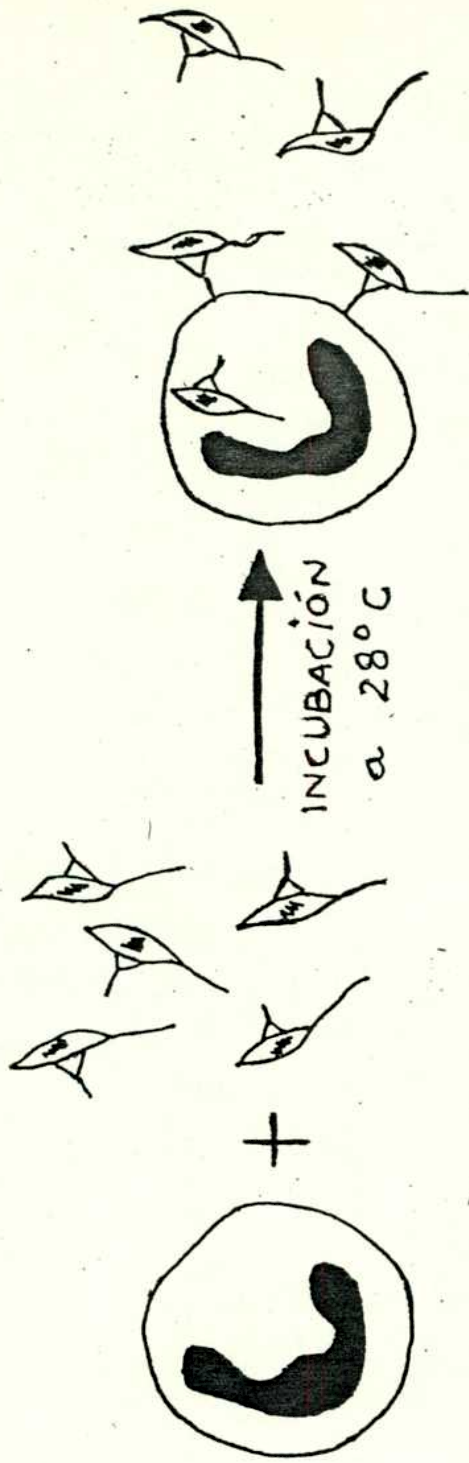
La reacción se llevó a cabo en tubos de plástico descartables (Polystor, Bs As). Para aumentar el contacto entre célula efectora y célula blanco, la mezcla de reacción se centrifugó durante 10 minutos a 700 g y a 4°C. Luego se incubó a 28°C por períodos variables (2-180 min). La viabilidad de los granulocitos, estimada por la prueba de exclusión de azul Tripán, no fue afectada por el procedimiento.

La reacción se interrumpió mediante el agregado de N-etil-maleimida (NEM) a una concentración de 1 mM final y por el agregado de complemento, que lisó los parásitos no ingeridos, ya sea que estuvieran libres o adheridos a la célula. Así, fue necesario incubar nuevamente la reacción, pero esta vez a 37°C durante 35 minutos para que actuara el complemento. La fuente del mismo, era suero humano normal fresco en una dilución final 1/4. Finalmente, el precipitado tratado con complemento se lavó 3 veces con buffer de fosfatos de Na 0.1 M pH 7.0 centrifugando a 2000 rpm durante 10 min y a 4°C. Se disolvió el precipitado en 3 ml de solución centelleadora de BRAY. La radioactividad asociada a los PMN se contó en un contador Beta Packard 3320.

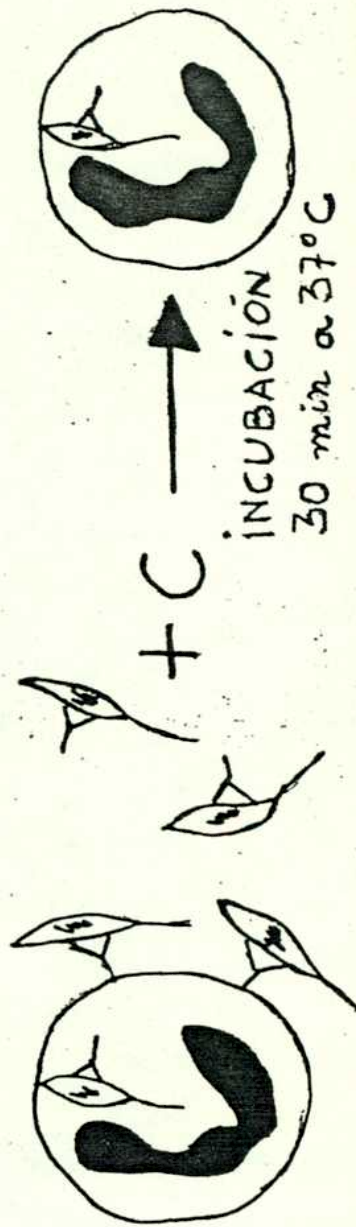
El porcentaje de la radioactividad incorporada a los PMN se expresó de la siguiente manera:

$$\%RI = \frac{\text{Radioactividad en el precipitado}}{\text{Radioactividad Total}} \times 100$$

Reacción de Fagocitosis



- a) 4°C
- b) N-ETILMALEÍMIDA
- c) ADICIÓN DE COMPLEMENTO (SHN)



LAVADO

Este porcentaje representó la actividad fagocítica de las células -- PMN.

La radioactividad total corresponde a la presente en 0.1 ml de Epi-³H, a la concentración utilizada en la reacción.

Fueron incluidos como controles los tubos de reacción sin incubación a 28°C o la reacción en presencia de NEM.

Los valores de Uridina tritiada asociada a los precipitados de epimastigotes después de la lisis por complemento en ausencia de células PMN (background de la reacción) eran de 9.5±1.6% para Epi-³H y 10.9±1.6% para Epi-³H-Ac.

Los resultados que se muestran en la Tabla 1 indican que aproximadamente el 90% de la radioactividad asociada al parásito podía ser liberada al sobrenadante por complemento en presencia o ausencia de anticuerpo anti-TC (Tabla 1 a-b). El dodecilsulfato de sodio (-- SDS) solubiliza 98% del material marcado con Uridina-³H (Tabla 1i). Como se observa en los puntos e-h de la tabla 1, el porcentaje de -- radioactividad asociada a la célula en ausencia de fagocitosis no -- era diferente de los controles (Tabla 1 a-d).

Las observaciones microscópicas, haciendo extendidos y tiñendo con -- May Grunwald-Giemsa, confirmaron estos resultados. Es decir, se pu-- dieron observar rosetas entre PMN tratadas con NEM y Epi-³H-Ac, an-- tes de la lisis por complemento. También se observaron rosetas, cuan-- do se realizó la reacción a 0°C.

Después de la lisis con complemento, no pudieron ser vistos parási-- tos externos en los preparados.

De esta forma, todos los controles realizados confirman la validez -
del método elegido.

TABLA 1
=====

Lisis de epimastigotes de T.cruzi por complemento

Reacción	Lisis por C' % \pm B.S.	n
a Epi- ³ H	90.5 \pm 1.6	8
b Epi- ³ H-Ac	89.1 \pm 1.6	8
c Epi- ³ H+NEM	82.7 \pm 3.2	8
d Epi- ³ H-Ac+NEM	74.8 \pm 2.2	8
e Epi- ³ H+FMN (30 min, 0°C)	87.1 \pm 0.3	8
f Epi- ³ H-Ac+FMN (30 min, 0°C)	86.4 \pm 1.7	8
g Epi- ³ H+NEM+FMN (30 min, 37°C)	86.8 \pm 1.3	24
h Epi- ³ H-Ac+NEM+FMN (30 min, 37°C)	81.1 \pm 1.3	22
i Epi- ³ H+SDS	98.3 \pm 0.2	19

0.2x10⁵ epimastigotes de T.cruzi marcados con Uridina-³H (Epi-³H) o Epi-³H sensibilizados con suero anti T.cruzi 1/20 a 1/200 (Epi-³H-Ac) reaccionaron con suero humano normal (SHN) 30 min. a 37°C en un volumen final de 0.4 ml. Alternativamente los Epi-³H o Epi-³H-Ac --- reaccionaron con SHN 1/4 en presencia de 1 ml de NEM y/o 1x10⁶ FMN. En todo los casos las reacciones fueron centrifugadas a 700 g a 4°C, durante 10 minutos, antes de la adición de complemento (C'). Las reacciones e y f fueron preincubadas a 0°C durante 30 min sin NEM, y -

las reacciones g y h, a 37°C durante 30 min, en presencia de 1 ml de NEM antes de la lisis por C'. La reacción i fue hecha agregando 1% de dodecilsulfato de sodio (SDS) a Epi-³H. El porcentaje de lisis era calculado de la siguiente manera: % lisis

$$100 - \left(\frac{\text{Radioactividad del precipitado}}{\text{Radioactividad total}} \times 100 \right)$$

M. Reacciones de Citotoxicidad y Fagocitosis en paralelo

En el punto III, se realizó un estudio paralelo de ambas reacciones, citotoxicidad y fagocitosis. El procedimiento seguido en estos casos fue el siguiente:

Se pretrataron los parásitos de acuerdo a la forma b descrita en - Materiales y Métodos, o sea, se distribuyó 100 μ l de Epi-³H y 100 μ l de antisuero anti-TC (concentración final 1/200) en los tubos de reacción correspondientes, incubándose luego a 28°C durante 15 minutos, o sea, la sensibilización se efectuó directamente en los tubos. Luego se agregaron diferentes cantidades de las células efectoras y el medio de cultivo para un volumen final de 0.4 ml. Se agitaron y centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se incubaron a - 28°C (0-180 min).

A los tubos de la reacción de fagocitosis se los trató como se describió previamente (Ver Reacción de Fagocitosis), y del mismo modo para los tubos de la reacción de Citotoxicidad (Ver Reacción citotóxica).

La capacidad citotóxica de las células efectoras se calculó de la siguiente manera:

Citotoxicidad % =

$$\frac{\text{Radioactividad en 0.1 ml de sobrenadante - liberación espontánea}}{\text{Radioactividad Total/4 - liberación espontánea}} \times 100$$

La radioactividad total corresponde a la radioactividad presente en un tubo conteniendo 0.1 ml de Epi-³H a la concentración requerida - en la reacción y suspendidos en Medio 199 Completo y 3 ml de solución centelladora de Bray.

La liberación espontánea corresponde a la cantidad de radioactividad liberada por los epimastigotes en ausencia de células efectoras. Mientras que el porcentaje de fagocitosis, se calculó así:

Fagocitosis % =

$$\frac{\text{Radioactividad en el precipitado de PMN} - \text{Background}}{\text{Radioactividad Total} - \text{liberación espontánea}} \times 100$$

Radioactividad Total - liberación espontánea

El background de la reacción corresponde a la cantidad de Uridina-³H asociada a los precipitados de 4×10^4 Epi-³H o Epi-³H-Ac después de la lisis por complemento, en ausencia de células efectoras. Los valores fueron $10 \pm 2\%$ ($\bar{X} \pm E.S.$ n:8) para Epi-³H-Ac.

La liberación espontánea corresponde a la cantidad de Uridina-³H liberada de epimastigotes, en ausencia de PMN durante el tiempo de la reacción; este valor osciló entre 3-20% a 0-180 min. de incubación y era restado de las cuentas totales.

La radioactividad total se medía como se describió recientemente para el cálculo del % de Citotoxicidad.

N. Liberación de Uridina-³H de los PMN que habían ingerido epimastigotes de T. cruzi.

Se realizó un experimento de liberación del isótopo a partir de leucocitos PMN que habían ingerido previamente Epi-³H-Ac. La reacción de fagocitosis fue interrumpida a los 30 minutos de incubación por agregado de Complemento solo, dejándolo actuar 30 minutos a 37°C. Se observó que a este tiempo, la radioactividad asociada a los PMN era similar si la NEM estaba o no presente durante la lisis por complemento (% Fagocitosis 30 min y complemento solo: $\bar{X} \pm E.S.$ 61 ± 8 , n:5; % Fagocitosis 30 min y complemento + NEM: $\bar{X} \pm E.S.$ 54 ± 8 ; n: 5). Los precipitados eran luego lavados 3 veces con buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.0, y suspendidos en 0.4 ml de Medio 199 Completo. Los tubos eran incubados nuevamente a 28°C, y se tomaron muestras a diferentes tiempos (0.1 ml del sobrenadante) y se las procesaba como en la reacción citotóxica. El porcentaje de liberación de Uridina-³H asociada a los PMN se calculó de la siguiente forma:

% de Liberación del isótopo =

$$\frac{4 \times \text{Radioactividad en 0.1 ml del sobrenadante}}{\text{Radioactividad en el precipitado} - \text{Background}} \times 100$$

PMN-Epi-³H-Ac a 30 minutos.

La cantidad de radioactividad liberada al sobrenadante era referida al total de cuentas presentes en el precipitado PMN-Epi-³H-Ac, al tiempo de iniciarse la reacción de liberación; a este valor se le restaba el "background" o sea, la radioactividad presente en el precipitado Epi-³H-Ac después de tratar con complemento y en ausencia de PMN.

R E S U L T A D O S

I. Acción citotóxica dependiente de anticuerpo

A. Acción citotóxica de los leucocitos humanos periféricos

De acuerdo a la técnica elegida, cuando se incubaron leucocitos periféricos (LP) con epimastigotes marcados con Uridina tritida (Epi-³H) en presencia de suero de conejo anti T.cruzi (suero -- anti-TC), se liberó una alta proporción de isótopo al sobrenadante c) $\bar{X} \pm E.S.$ 36.5 \pm 4.4%, n:6, mientras que con suero humano normal o en ausencia de suero, la liberación fue baja b) $\bar{X} \pm E.S.$ 17.6 \pm 3.5%, n:6 y a) $\bar{X} \pm E.S.$ 14.0 \pm 2.4%, n:6 respectivamente, y similar a la observada en ausencia de células efectoras d) $\bar{X} \pm E.S.$ 13.3 \pm 2.8%, n:6 (Figura 11). Como ya se explicó anteriormente en Materiales y Métodos, el porcentaje de Uridina-³H liberada es una medida de la lisis producida por las células efectoras. Comparando estos grupos a b, c y d, resultó que el grupo c es significativamente diferente de los restantes (p<0.001) mientras que ellos a su vez no difieren entre sí (p<0.5).

El antisuero de conejo utilizado tenía un título de anticuerpo aglutinante de 1/2048 y los sueros humanos normales empleados como control, títulos menores que 1/32, los cuales fueron considerados negativos.

El tiempo de incubación elegido fue de 3 horas a 28°C ; ya -- que pruebas previas realizadas a 37°C, dieron en ausencia de células efectoras altos niveles de liberación del isótopo.

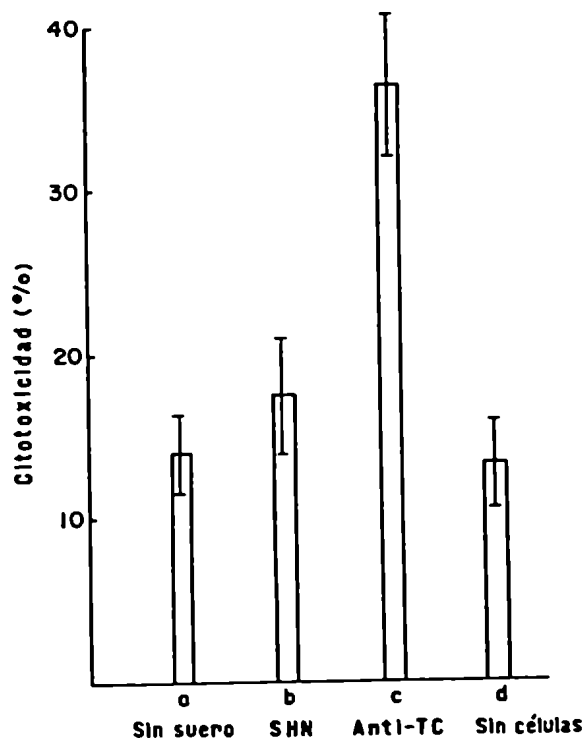


Figura 11: Acción citotóxica de los leucocitos humanos periféricos contra epimastigotes de T.cruzi.

Se incubaron 5×10^5 Epi- ^3H con 2×10^6 leucocitos humanos periféricos en 0.4 ml de Medio 199 completo, conteniendo una dilución final de 1/400 de antisuero de conejo anti-T.cruzi (anti-TC) (c); suero humano normal (SHN) (b); o sin suero (a), durante 3 horas a 28°C. Se incluye el control en ausencia de células (d), expresándose la media $(\bar{X}) \pm \text{E.S.}$ de 6 experimentos.

Los epimastigotes utilizados fueron cultivados y marcados como se describió en Materiales y Métodos (células blanco, parte 1-a). En todos los experimentos realizados con leucocitos totales se utilizará este tipo de células blanco.

Se consideró como 100% de Uridina-³H liberada, la radioactividad presente en 0.1-0.2 ml del sobrenadante de un tubo, conteniendo - Epi-³H o la concentración usada en la reacción y 100 μ l de Tritón X-100 al 4% o 100 μ l de dodecilsulfato de sodio (SDS); como se describió con detalle en Materiales y Métodos.

1. Prueba de distintos antisueros

Habiendo demostrado la capacidad citotóxica de los leucocitos humanos periféricos contra epimastigotes de T.cruzi en presencia - del suero de conejo anti-T.cruzi, quisimos ver qué fracción de las inmunoglobulinas era responsable de dicha actividad. Se hizo una - precipitación con SO_4Na_2 12% a partir del suero inmune, obteniéndose se la fracción γ -globulina, parcialmente purificada; ésta fue probada en la reacción citotóxica, junto con el suero total como control.

Los resultados se observan en la Tabla 2 .

Cuando los leucocitos se incubaron en presencia de suero de - pacientes chagásicos crónicos (n=4), se observó que desarrollaban actividad citotóxica contra los epimastigotes marcados (Epi-³H). - Debido al reducido número de pacientes empleados no pudimos correlacionar la citotoxicidad con la actividad clínica o serológica.

Se incluyeron como controles, la incubación de las células e - fectoras y los parásitos con suero humano normal (SHN) y suero de conejo normal (SCN), y también el control en ausencia de células e - fectoras; en todos los casos el porcentaje de liberación fue menor del 10%, difiriendo en forma significativa de los valores obteni-- dos en presencia de suero inmune.

TABLA 2

Citotoxicidad dependiente de anticuerpo de leucocitos humanos contra T.cruzi en presencia de suero de conejo anti-T.cruzi, γ -globulina de conejo anti-T.cruzi y suero de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

Suero ^a	% de Uridina- ³ H liberada.	Título aglutinante de epimastigotes de <u>T.cruzi</u> .
Conejo anti-TC 1	31.8	1/2048
Conejo anti-TC 2	41.8	1/4026
γ -globulina de conejo anti-TC	21.7	1/1024
Ch 1	16.3	1/64
Ch 2	25.6	1/4096
Ch 3	21.8	1/64
Ch 4	20.7	1/64
SCN	9.6	1/16
SHN	9.6	1/32
-	9.6	----

Fueron incubados 5×10^5 epimastigotes de T.cruzi marcados con Uridina-³H (Epi-³H) y 2×10^6 leucocitos de sangre periférica (LP) con el antisuero o con el suero control durante 3 hs a 28°C, en 0.4 ml de Medio 199 Completo.

a) La dilución final utilizada en todos los casos fue de 1/80. Los epimastigotes se obtuvieron según el procedimiento 1-a, descrito en Materiales y Métodos.

2. Pretratamiento de las células efectoras y blanco con suero anti T. cruzi o suero control.

En todos los experimentos de citotoxicidad descritos hasta aquí, - el anticuerpo específico anti T.cruzi, ya sea de conejos inmunizados o de pacientes chagásicos crónicos, estaba presente durante todo el transcurso de la reacción.

quisimos saber si su presencia era un requisito para que ocurriera el efecto lítico, o si era suficiente pretratar o presensibilizar - las células blanco con el anticuerpo, lavar o sea quitar el anti--- cuerpo en exceso, no pegado, y luego enfrentarlas con las células e fectoras. Los leucocitos periféricos eran citotóxicos contra epimasti gotes pretratados (Epi-³H-anti TC= 50.8%; Epi-³H-SHN = 20.4%) o - con el anticuerpo durante el transcurso de la reacción (Epi-³H-an-ti-TC = 60.0%; Epi-³H-SHN= 24.8%) en un grado similar.

Además, el pretratamiento de las células efectoras con el suero in-mune dio niveles de lisis similares al suero control (Ver Tabla 3), lo cual descartó la existencia de anticuerpos citofílicos, y aseguró la especificidad de la reacción citotóxica.

TABLA 3

Efecto del pretratamiento de células efectoras y células blanco con suero inmune anti T.cruzi.

	% de Uridina- ³ H liberada con :	
	Suero inmune ^a	Suero control ^b
Pretratamiento de epimastigotes de <u>T.cruzi</u> ^c	50.8	20.4
Pretratamiento de leucocitos ^d	25.6	13.0
Suero inmune o control presente durante la reacción ^e	60.0	24.3

a) Antisuero de conejo anti homogenato total de T.cruzi (anti-TC), diluido 1/400 final.

b) Se usó como suero control, suero humano normal (SHN) en una dilución final de 1/400.

c) 5×10^5 epimastigotes de T.cruzi (Epi-³H) ^(Procedimiento 1-a) fueron tratados con anti-TC 1/400 o con SHN 1/400 por 15 min a 28°C, lavados 3 veces con Medio 199 Completo, y luego incubados con 2×10^6 leucocitos de sangre periférica (LP) 3 horas a 38°C, en un volumen final de 0.4 ml.

d) 2×10^6 de leucocitos de sangre periférica fueron tratados con una dilución 1/400 de anti-TC o con SHN por 15 min a 28°C, lavados 3 veces con buffer de fosfatos de Na pH 7.0, suspendidos en 0.4 ml de Medio 199 conteniendo 5×10^5 Epi-³H e incubados por 3 horas a 28°C.

e) La reacción se llevó a cabo en presencia de anti-TC o SHN e incubados durante 3 hs a 28°C como se describió en Materiales y Métodos.

3. Cinética de la reacción

Nos interesó estudiar cual era el comportamiento de la reacción citotóxica durante el transcurso del tiempo. Así fue que se hizo una cinética de la reacción que abarcó un amplio rango, desde los 30 minutos hasta las 10 horas de incubación. La relación célula efectora: célula blanco utilizada en este experimento fue de 4:1, mezclando 2×10^6 células efectoras con 5×10^5 Epi- ^3H y la dilución de anticuerpo fue de 1/400 final (suero de conejo anti-TC).

La actividad citotóxica de los leucocitos de sangre periférica contra Epi- ^3H en presencia de suero inmune aumentó progresivamente hasta las 4 horas de incubación a 28°C , alcanzando luego una zona de plateau.

En contraste, en ausencia de suero, si bien los niveles de liberación alcanzados fueron significativamente diferentes a los obtenidos en presencia de suero inmune, éstos aumentaron progresivamente con el tiempo de incubación; la lisis de parásitos en ausencia de células efectoras se mantuvo en un nivel bajo de lisis y constante durante todo el transcurso de la reacción.

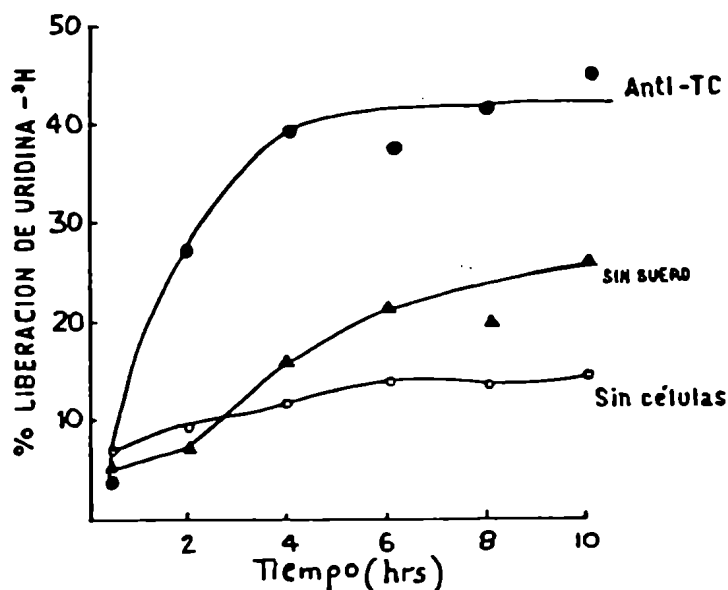


Figura 12: Cinética de la reacción.

4. Viabilidad de las células efectoras

Se realizó una prueba de viabilidad con el propósito de saber si los leucocitos humanos periféricos eran dañados durante el transcurso de la reacción .

La misma consistió en realizar la reacción incubando las células efectoras marcadas con un isótopo radioactivo, en este caso se eligió ^{51}Cr (LP- ^{51}Cr) junto con las células blanco no marcadas (Epi) en presencia o ausencia de anticuerpo anti-TC.

Se observó la liberación de ^{51}Cr a lo largo del tiempo, tomando muestras del sobrenadante a las 30', 1h, 2h y 18hs, siendo ésta un índice sensible del daño celular.

En los tiempos tempranos de incubación los leucocitos mantenían su integridad liberando bajos porcentajes de ^{51}Cr aproximadamente 15% - pero ya a tiempo prolongados (18hs) liberaron aproximadamente el 50% indicando cierto grado de lesión. (Ver Tabla 4).

De acuerdo con estos resultados, para la mayoría de los experimentos el tiempo de incubación elegido fue de 3 a 4 horas, ya que se conservaba la integridad de los leucócitos, y además era lo suficientemente sensible para detectar el efecto citolítico. (Ver Figura 12)

TABLA 4

Liberación del isótopo de leucocitos marcados durante la reacción.

Tiempo de incubación-----	Liberación de ⁵¹ Cr (%)				
	Epi	Epi-anti-TC	Epi-SHN	anti-TC	SHN
30 min	22.0	18.0	7.1	16.0	16.0
1 hr	16.5	12.6	16.2	20.7	14.4
2 hr	16.6	10.4	14.7	9.5	14.7
18 hr	50.7	58.5	45.0	54.0	30.7

La reacción se realizó incubando 2×10^6 leucocitos marcados - con ⁵¹Cr y 5×10^5 epimastigotes de T.cruzi sin marcar (Epi) en 0.4 ml de Medio 199 Completo sin antisuero o con una dilución final de 1/400 de suero de conejo anti-T.cruzi (anti-TC) o con suero humano normal (SHN) a 28°C. Los tubos control sin Epi fueron puestos simul^utáneamente.

El porcentaje de ⁵¹Cr liberado se calculó como se describió detalladamente en Materiales y Métodos.

B. Acción citotóxica de leucocitos mono y polimorfonucleares humanos

1. Identificación de la célula efectora

Como hemos demostrado en la parte I-A los leucocitos humanos periféricos eran citotóxicos contra epimastigotes de T.cruzi en presencia de suero inmune.

Con el propósito de determinar qué tipo de célula era la responsable del efecto observado, los leucocitos totales se fraccionaron por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque. De esta forma se utilizaron en la reacción 2 tipos de poblaciones leucocitarias: una población de leucocitos polimorfonucleares (PMN) compuesta por neutrófilos y eosinófilos con una contaminación de $6\pm 1\%$ ($n=31$) leucocitos mononucleares, y una población de leucocitos mononucleares compuesta de $96\pm 1\%$ ($n=15$) de linfocitos y monocitos, con una contaminación de células PMN.

Los datos que se representan en la Tabla 5 indican que los leucocitos PMN eran las células involucradas en el proceso lítico. La citotoxicidad era óptima cuando se enfrentaban los PMN con los T.cruzi en una relación de 10:1, al incrementar esta relación se observa cierta inhibición en la citotoxicidad. Se desconoce el porqué de esta interferencia. Por otro lado los leucocitos mononucleares no tenían efecto citotóxico apreciable en las 3 diferentes relaciones usadas, ya que los niveles de isótopo liberado no sobrepasaron en ningún caso el 10%. Es de destacar que el % de liberación espontánea o sea de los Epi- ^3H en ausencia de Ac y células efectoras, fue del 6%. Cuando se usó una mezcla de leucocitos PMN y LM en una relación de PMN:LM:Epi- ^3H de 5:20:1 se observó que el efecto citotóxico no era aditivo, de lo contrario, y a pesar de la poca contribución de las células mononucleares, se hubiera obtenido un 39% de lisis, en lugar del 30% observado. En la Figura 13 se representan las diferencias entre la citotoxicidad producida en presencia y ausencia de Ac.

por ambas células: leucocitos mononucleares y polimorfonucleares, y en diferentes relaciones célula efectora/célula blanco desde una relación 1:1 hasta una relación de 25:1. En el caso de los leucocitos mononucleares las diferencias permanecieron en un nivel bajo en todas las relaciones usadas, no así con los leucocitos PMN, en donde -- existió un aumento proporcional a la relación usada (nuevamente vemos la disminución en la relación 25:1 por exceso de células). En todos los casos, si comparamos ambos tipos celulares la diferencia entre ellos es significativa, lo cual nos permite afirmar nuevamente -- que los leucocitos PMN son las células responsables de la reacción -- de citotoxicidad dependiente de anticuerpo.

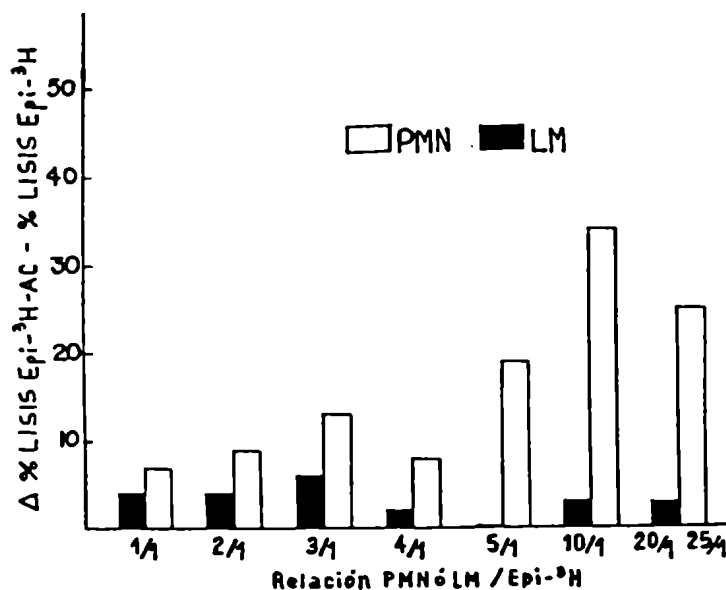


Figura 13: Identificación de la célula efectora

Los parásitos utilizados en este experimento y en los siguientes, -- fueron cultivados y marcados como se describió en Materiales y Métodos (Células blanco, parte 1-b)

Las barras indican el porcentaje de citotoxicidad que resulta de la diferencia entre la lisis de parásitos sensibilizados (Epi-³H-AC) y la lisis de parásitos sin sensibilizar (Epi-³H) producida por células mono y polimorfonucleares humanas.

TABLA 5

Identificación de la célula efectora

Célula efectora	Relación célula efectora/ Epi- ³ H	Citotoxicidad (%) Epi- ³ H - anti-TC	Epi- ³ H
PMN	5:1	29	10
PMN	10:1	50	8
PMN	25:1	35	7
LM	5:1	7	6
LM	10:1	9	6
LM	20:1	10	7
PMN LM	5:20:1	30	9
---	--	6	6

Se incubaron 2×10^5 - 5×10^5 epimastigotes marcados solos (Epi-³H) o presensibilizados con antisuero de conejo anti-T.cruzi (Epi-³H-anti-TC), con leucocitos polimorfonucleares (PMN) y/o mononucleares (LM) durante 3 horas a 28°C en la proporción indicada. La concentración final del antisuero fue de 1/200 .

Los epimastigotes fueron obtenidos según se describió en Materiales y Métodos , procedimiento 1-b.

2. Efecto de la centrifugación Inicial

En la Tabla 6 se observan los valores promedio de la citotoxicidad dependiente de Anticuerpo de los leucocitos PMN purificados contra epimastigotes de T.cruzi.

Se usaron 2 relaciones diferentes de célula efectora:célula blanco: relación PMN/Epi-³H 2:1 y 10:1, y un suero de conejo anti T.cruzi en una concentración final de 1/400. Con ambas relaciones se observó una diferencia significativa entre el grado de lisis alcanzado por epimastigotes sensibilizados con el suero anti-TC y los parásitos no sensibilizados ($p < 0.01$, Prueba de "t"). Esta diferencia se observó con o sin centrifugación previa:

Uno de los requerimientos para que ocurra la lisis en la CAD era el contacto entre las células efectoras y las células agredidas. En base a esto, se comparó el efecto o no sobre el grado de lisis de la centrifugación antes de comenzar el período de incubación. Vimos que ésta como era de esperar, ya que aumenta el contacto, aumentaba el efecto citotóxico, por esta razón los experimentos se realizaron siempre centrifugando a 4°C durante 10 min a 700 g antes de comenzar la incubación.

En ausencia de anticuerpo se alcanzó cierto grado de citotoxicidad inespecífica, la cual fue mayor cuando se favorece el contacto y cuando aumenta el número de células efectoras.

Los controles de liberación de ARN marcado, en presencia de anticuerpo, sin células efectoras, son menores que en ausencia de anticuerpo. Esto no parece deberse a un efecto protector producido por una mayor cantidad de proteína, ya que la concentración proteica se incrementa en sólo 5% sobre la proteína total del medio.

TABLA 6

Citotoxicidad dependiente de anticuerpo de leucocitos polimorfonucleares humanos purificados contra epimastigotes de T.cruzi.

Reacción	<u>Con Centrifugación Inicial</u>		<u>Sin Centrifugación</u>	
	Relación PMN/Epi- ³ H		Relación PMN/Epi- ³ H	
	2:1 (n=6)	10:1 (n=5)	2:1 (n=6)	10:1 (n=5)
PMN+Epi- ³ H anti-TC	36 [±] 4	49 [±] 3	27 [±] 2	37 [±] 4
PMN+Epi- ³ H	20 [±] 3	30 [±] 3	14 [±] 2	18 [±] 2
Epi- ³ H anti-TC		12 [±] 2		13 [±] 3
Epi- ³ H		18 [±] 4		21 [±] 4

Se incubaron 2×10^5 Epi-³H con 4×10^5 o 2×10^6 leucocitos polimorfonucleares (PMN), con o sin adición de antisuero de conejo anti T.cruzi (anti-TC) en una dilución final de 1/400 durante 3 horas a 28°C, directamente o después de centrifugar a 700 g, 10 minutos y a 4°C. Las diferencias entre a y b son estadísticamente significativas en los 4 casos ($p < 0.01$, prueba de "t").

3. Cinética de la reacción

La actividad citotóxica dependiente de anticuerpo de los leucocitos PMN humanos purificados contra epimastigotes de T.cruzi se incrementó hasta las 7 horas de incubación a 28°C (Fig. 14). A las 18 hs el efecto no se pudo visualizar claramente por el incremento de la lisis espontánea de los parásitos y, por la disminución de la viabilidad de las células efectoras.

A pesar de que los datos obtenidos a las 7 horas de incubación son más claros, se eligió un tiempo de incubación de 3 horas -- por resultar suficiente para detectar el efecto lítico, por la integridad de las células efectoras y por razones prácticas.

La reacción con altas concentraciones de células (Relación PMN/Epi-³H 10:1, Fig. 14, A) alcanzó valores altos de lisis muy rápidamente, mientras que a bajas concentraciones (Relación PMN/Epi-³H 2:1, Fig. 14, B), la curva de la cinética de la reacción mostró un pequeño retardo en su fase temprana.

El control en ausencia de suero inmune experimentó un pequeño aumento hasta las 3 horas, permaneciendo luego en un estado estacionario; siendo los niveles de lisis de aproximadamente 20-30%. En ausencia de células efectoras, el nivel de lisis se mantuvo constante durante el transcurso del tiempo.

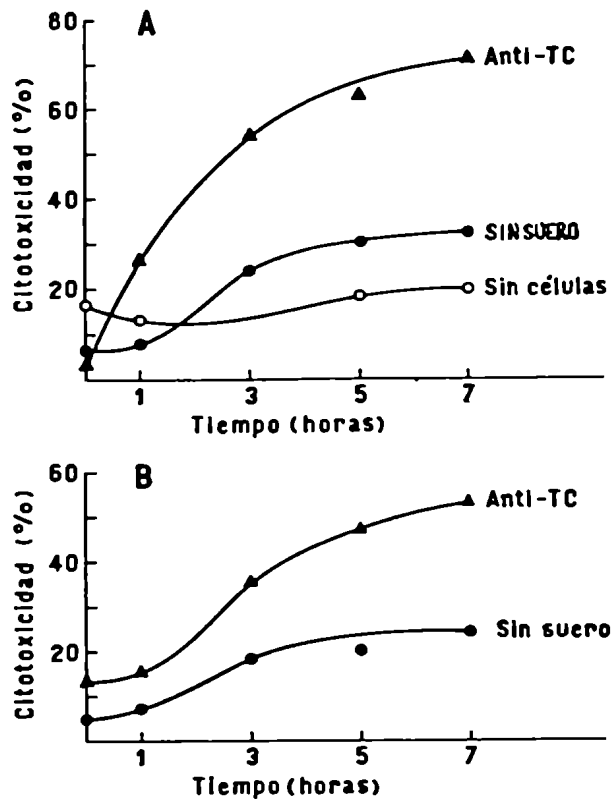


Figura 14: Cinética de la reacción citotóxica

Se incubaron 2×10^5 Epi-³H con 2×10^6 (A) o 4×10^6 (B) de leucocitos polimorfonucleares en presencia de una dilución 1/400 de antisuero de conejo anti T.cruzi (anti-TC) durante 0,1,3,5 y 7 - horas a 28°C. Se incluyó el control sin células y en ausencia - de suero inmune.

4. Dependencia de la concentración de anticuerpo y de células efectoras.

Los datos representados en las Figuras 15 y 16 indican que el nivel alcanzado por la reacción citotóxica era dependiente de la concentración de anticuerpo y del número de células efectoras

La citólisis de los epimastigotes en presencia de suero anti T.cruzi (Epi-³H-anti TC) aumentó proporcionalmente a la concentración de células efectoras, pero no siguió sin embargo, una relación lineal; esto fue más evidente en altas concentraciones de células, indicando que el exceso de las mismas interfería con su actividad efectora.

En cuanto a la concentración de anticuerpo, la reacción era altamente eficaz con diluciones altas de anticuerpo (concentración final 1/4000) a semejanza de lo que ocurre en otros sistemas de Citotoxicidad dependiente de anticuerpo. Como se demuestra en la Figura 15, la dependencia se demostró usando 2 relaciones diferentes de PMN/Epi-³H, siendo éstas, 10:1 y 2:1; más adelante (Figura 24), veremos, que superando la concentración final de anticuerpo final de 1/4000 utilizada aquí, el Ac será efectivo aún a diluciones tan elevadas como $1/10^5$, convirtiendo a esta reacción citotóxica en un sistema altamente eficiente.

Con respecto a los controles, los niveles de lisis alcanzados en presencia de suero humano normal (Figura 15) fueron bajos y se mantuvieron en un nivel constante, en todas las diluciones de suero usadas. En otro experimento en ausencia de Ac anti-TC (Figura 16), el porcentaje de liberación del isótopo aumentó progresivamente hasta la relación célula efectora:célula blanco de 50:1. En las relaciones más elevadas 50:1 y 100:1 el nivel alcanzado fue de 40% y, aunque en estos últimos puntos la diferencia con respecto a la lisis alcanzada en presencia de suero inmune siguió siendo significativa, disminuyó la sensibilidad de la reacción en forma notable.

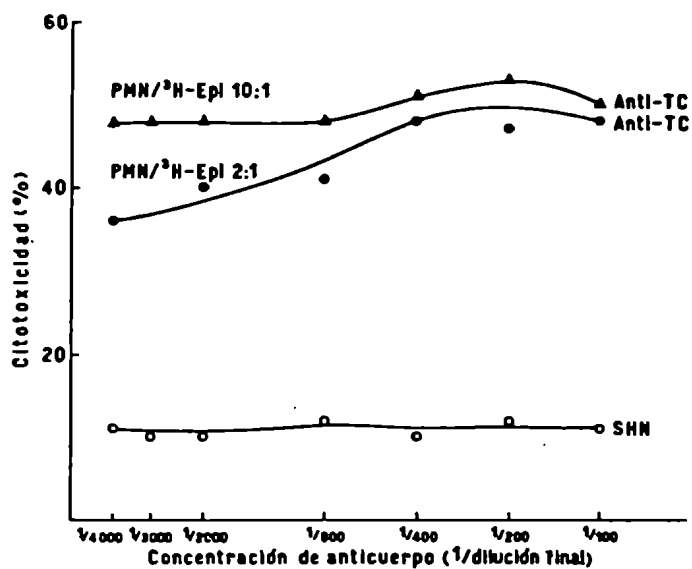


Figura 15 : Titulación de la concentración de anticuerpo anti -- T.cruzi.

Se incubaron 2×10^5 Epi-³H con 4×10^5 o 2×10^6 leucocitos PMN y una dilución variable de antisuero de conejo anti-T.cruzi (anti-TC) o suero humano normal (SHN), durante 3 horas a 28°C.

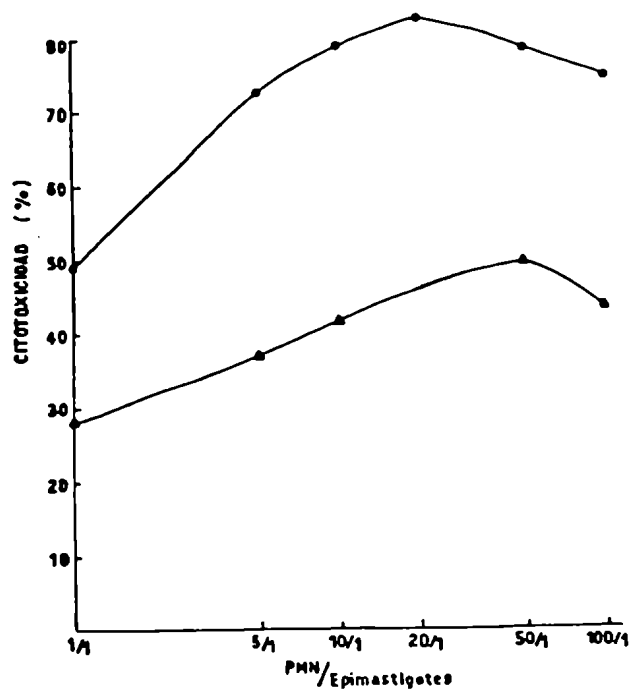


Figura 16 : Titulación de células efectoras

Se incubaron diferentes cantidades de leucocitos PMN con 4×10^6 - Epi- 3 H o Epi- 3 H-Ac en la proporción indicada, durante 3 horas a 28°C .

Las reacciones fueron hechas por duplicado, son graficados los valores promedio de 2 experimentos.

El cálculo del porcentaje de citotoxicidad se hizo, tal como se describió en Materiales y Métodos teniendo en cuenta la radioactividad total.

5. Clases de Anticuerpo involucradas

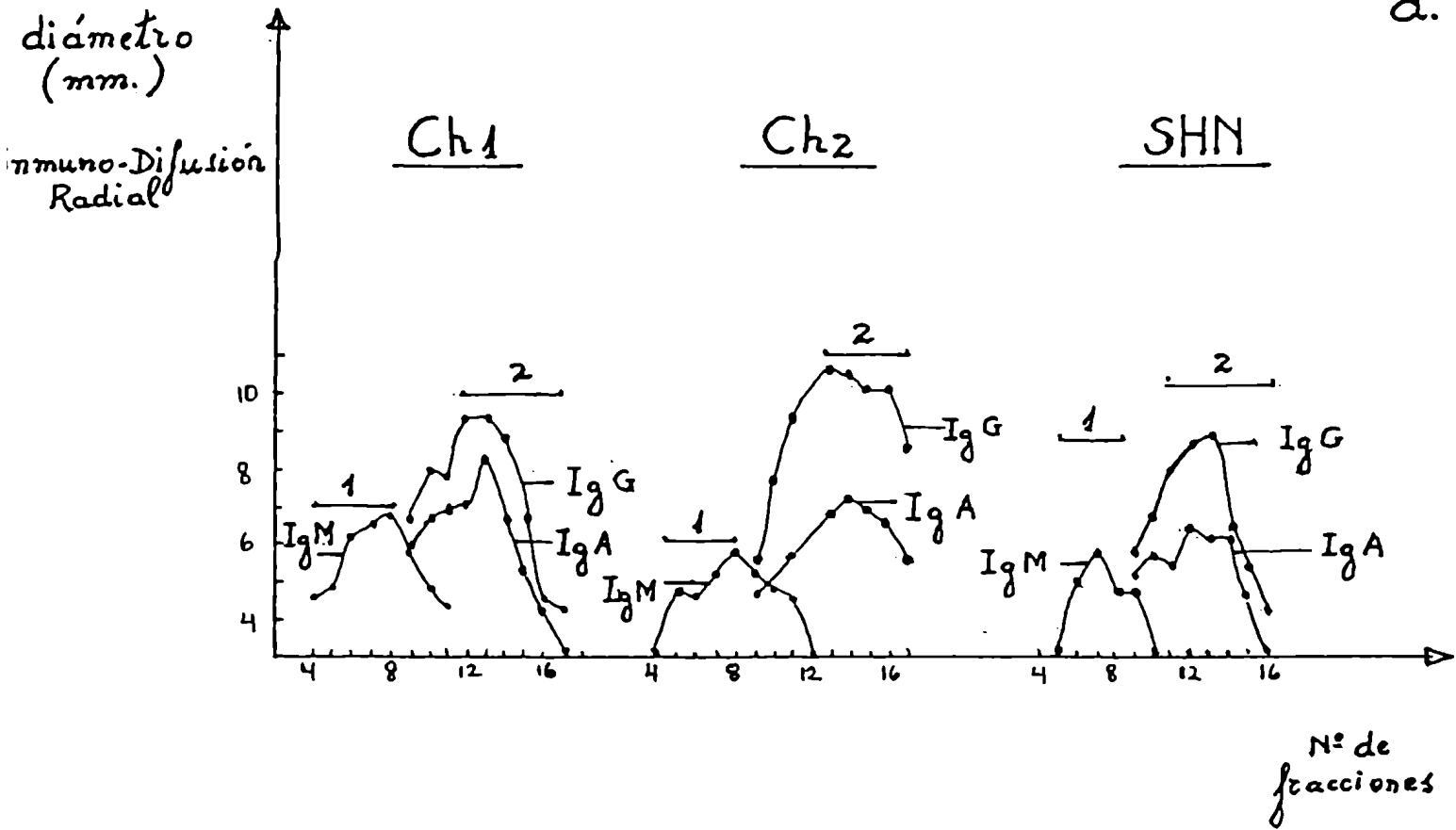
Se purificaron por ultracentrifugación sobre gradientes de sacarosa, sueros de pacientes chagásicos crónicos. Se procesó en igual forma suero humano normal a modo de control. En las fracciones obtenidas se midió la concentración de IgG, IgA e IgM por inmunodifusión radial, la concentración proteica y la actividad promotora de CAD.

Los resultados de una preparación representativa pueden observarse en la Figura 17. Se recolectaron 2 picos: uno conteniendo IgM sin IgG ni IgA, 1 y otro conteniendo IgG+IgA en ausencia de IgM, 2. En la Figura 17 b se demuestra que la actividad promotora de CAD está asociada a la fracción que contiene IgG+IgA. En dicha figura se incluye como control la actividad del suero previa al fraccionamiento, 3. El SHN no mostró actividad alguna en los picos equivalentes a la fracción 1 y 2 o previo al fraccionamiento.

Teniendo en cuenta por trabajos previos de citotoxicidad dependiente de anticuerpo que la IgA no puede inducir dicha reacción, la actividad presente en el pico 2 puede ser atribuible a anticuerpos de clase IgG.

GRADIENTES DE SACAROSA

a.



b.

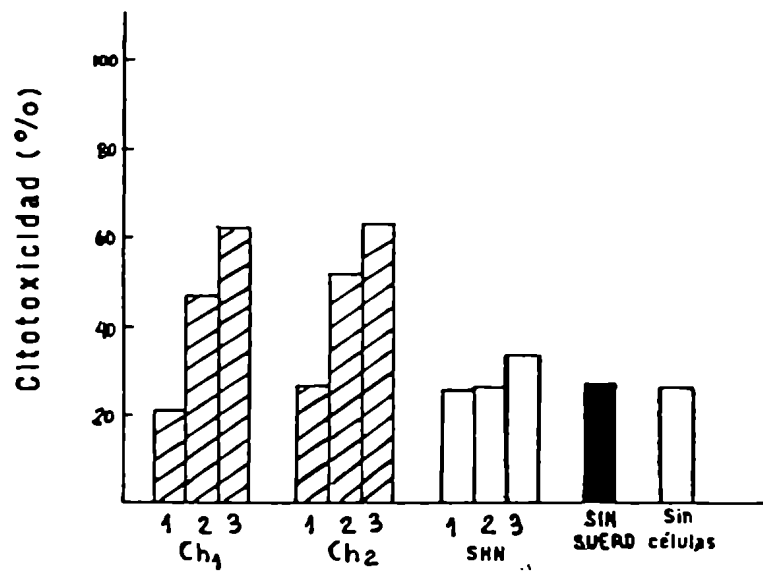


Figura 17: Clases de Anticuerpo involucradas

6. Inhibición de la reacción citotóxica con γ -globulina agregada.

La reacción citotóxica se realizó en presencia de diferentes concentraciones de γ -globulina agregada por acción del calor. Se observó una fuerte inhibición de la actividad de las células efectoras (PMN) que dependía de la concentración, lo cual indicaría que el receptor para el fragmento Fc de las inmunoglobulina presente en los PMN, estaría involucrado en el proceso, ya que su bloqueo por γ -globulina agregada interfería con el desarrollo de la reacción citotóxica. La adición de γ -globulina agregada provocó también inhibición de la citotoxicidad inespecífica, o sea en ausencia de anticuerpo (Ver Figura 18).

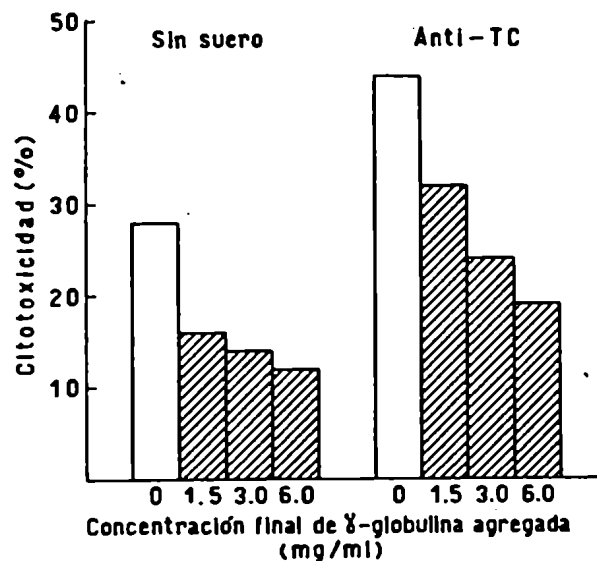


Figura 18: Inhibición de la reacción citotóxica con γ -globulina agregada.

Se incubaron 2×10^5 $^3\text{H-Epi}$ con 2×10^6 leucocitos polimorfonucleares y concentraciones variables de γ -globulina agregada en presencia de una dilución final de 1/400 de antisuero de conejo anti-T.cruzi (anti-TC) o sin suero, durante 3 horas a 28°C.

7. Experimento de "células inocentes"

Con el fin de investigar si la lisis producida por los leucocitos PMN contra los epimastigotes de T.cruzi en presencia de Ac específico (Epi-³H-Ac), era debida a la liberación de factores solubles, se diseñó el experimento denominado de las "células inocentes".

En la Figura 19 se observó en primer lugar los niveles de lisis alcanzados por células PMN contra epimastigotes marcados (Epi-³H) en presencia o ausencia de Ac específico, siendo estadísticamente significativa la diferencia, como ya ha sido previamente demostrado.

Provocando la reacción citolítica al enfrentar los PMN con Epi-Ac no fue posible inducir la muerte de epimastigotes marcados colocados en el mismo tubo de reacción a manera de "células inocentes".

Esto nos sugiere, que para que ocurra una citólisis es necesario un estrecho contacto entre la célula agredida y la agresora descartando la liberación de factores al medio.

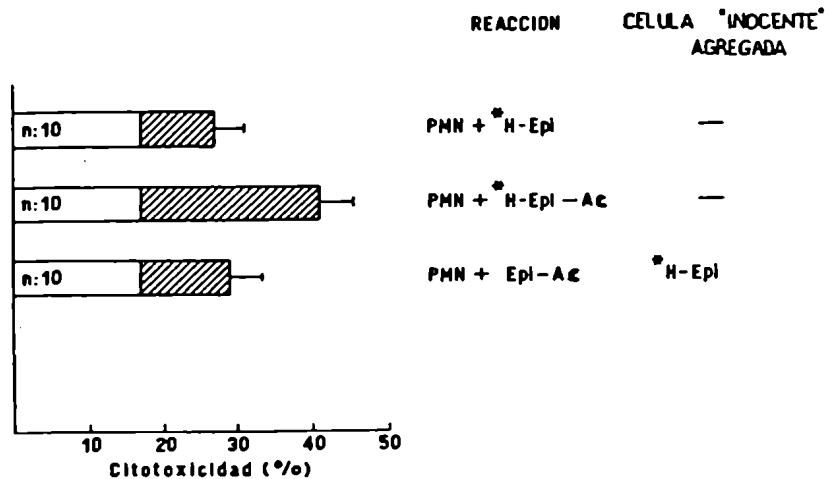


Figura 19: Experimento de "células inocentes"

Se representa el % de liberación de Uridina-³H alcanzado en ausencia o en presencia de células efectoras (barras blancas y sombreadas, respectivamente). Los PMN se enfrentaron con los epimastigotes marcados o no, y presensibilizados con Ac anti-TC (se eliminó el exceso de Ac por lavado).

II. ACTIVIDAD FAGOCITICA DEPENDIENTE DE ANTICUERPO DE LOS LEUCOCITOS PMN HUMANOS.

Hasta aquí habíamos demostrado que los leucocitos PMN humanos periféricos producían lisis de formas de cultivo de T.cruzi en presencia de anticuerpo específico; dado que estas células son fagocíticas por excelencia, quisimos saber si previo a la liberación del isótopo, ocurría un fenómeno de ingestión temprana por parte de estas células. Para ello desarrollamos un método radioisotópico de medición de fagocitosis.

1. Cinética de la reacción

Como se observa en la figura 20 la ingestión de epimastigotes de T.cruzi marcados con Uridina tritiada es un proceso rápido. La reacción alcanzó un máximo a los 30 minutos, decreciendo luego, ya que se comienza a liberar la radioactividad al sobrenadante. A los 30 min la radioactividad liberada al sobrenadante osciló entre 5-15% de acuerdo con estudios previos. Así la cantidad de radioactividad asociada a las células PMN a tiempos cortos de incubación, estaba influenciada principalmente por la toma de epimastigotes.

Es importante destacar, que la fagocitosis en ausencia de Ac anti-TC aumentó en forma progresiva con el tiempo, así vemos en la Tabla 7, que ya a los 180 minutos de incubación no existía diferencia significativa entre la fagocitosis de parásitos sensibilizados y no sensibilizados con el anticuerpo específico; mientras que a los 60 minutos, si bien seguía siendo significativa la diferencia, había disminuído con respecto, al valor hallado a los 10 minutos de incubación.

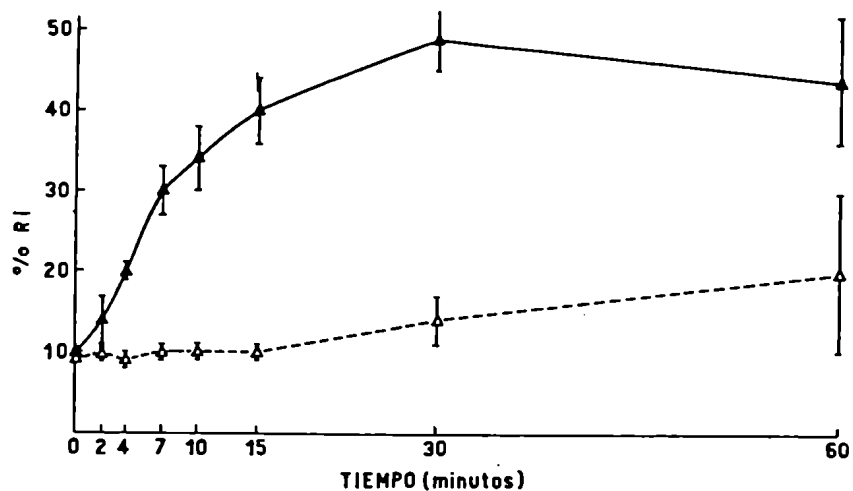


Figura 20: Cinética de la reacción de fagocitosis de epimastigotes

de T.cruzi por leucocitos PMN humanos.

Fueron incubados 4×10^4 Epi- ^3H o Epi- ^3H -Ac con 4×10^5 PMN (Relación célula efectora:célula blanco 10:1) 0-60 min, a 28°C . La sensibilización de los parásitos con el Ac anti-TC, se efectuó en el tubo de reacción como se describió en Materiales y Métodos.

Las reacciones fueron hechas por triplicado, son graficados los valores promedio de 2 reacciones.

El porcentaje de Uridina- ^3H asociada a los leucocitos PMN fue determinada tal como se describió anteriormente en Mat. y Métodos.

TABLA 7

Actividad fagocítica dependiente de anticuerpo de leucocitos PMN - humanos

Incubación a 28°C	RI % \pm ES		n	p
	Epi- ³ H	Epi- ³ H-Ac		
10 min	13 \pm 3	44 \pm 7	6	0.001
60 min	21 \pm 5	36 \pm 8	8	0.05
180 min	13 \pm 1	20 \pm 5	6	n.s.

Las células PMN (4×10^5) fueron incubadas con epimastigotes de T.cruzi (4×10^4) sensibilizados (Epi-³H-Ac) o no sensibilizados (Epi-³H) a una relación PMN/Epi de 10:1, durante 10,60 y 180 minutos a 28°C.

Se determinó el porcentaje de radioactividad incorporada a los PMN (% RI) como se describió en Materiales y Métodos. Los valores p (Test de Student) para Epi-³H vs Epi-³H-Ac son señalados en cada tiempo.

2. Dependencia de la concentración de anticuerpo y de células efectoras.

Los resultados que se observan en la Figura 21 demostraron -- que la reacción dependía de la relación célula efectora a célula blanco. Así, se demostró que a medida que aumentaba el número de células PMN aumentaba la radioactividad incorporada, alcanzando una zona de plateau en la relación 20:1 de PMN/ Epi-³H-Ac siendo el porcentaje alcanzado de 30-40%.

Desarrollando la reacción a una relación 10:1 sobre la base del % RI a los 30 min de incubación el número promedio de epimastigotes sensibilizados ingeridos era 0.04 mientras el número de parásitos no sensibilizados incorporados era de 0.003. Si la reacción era llevada a cabo aumentando el número de parásitos ofrecidos a las células efectoras, se pudo obtener valores más elevados, pero disminuía la especificidad de la reacción.

La observación microscópica reveló que nunca había más que un parásito ingerido por granulocito, después de 10 min de incubación, la proporción de células PMN que habían ingerido parásitos sensibilizados en una relación PMN/Epi-³H de 10:1 era de 5-8%. Bajo las mismas condiciones, sólo 0-3% de las células PMN contenían epimastigotes no sensibilizados.

Como se observó en la Figura 21 si se variaba la concentración de anticuerpo manteniendo constante la relación célula efectora/ célula blanco, la radioactividad incorporada a las células PMN aumentaba con la concentración de anticuerpo. En la zona de exceso de anticuerpo se observaba aglutinación de T.cruzi.

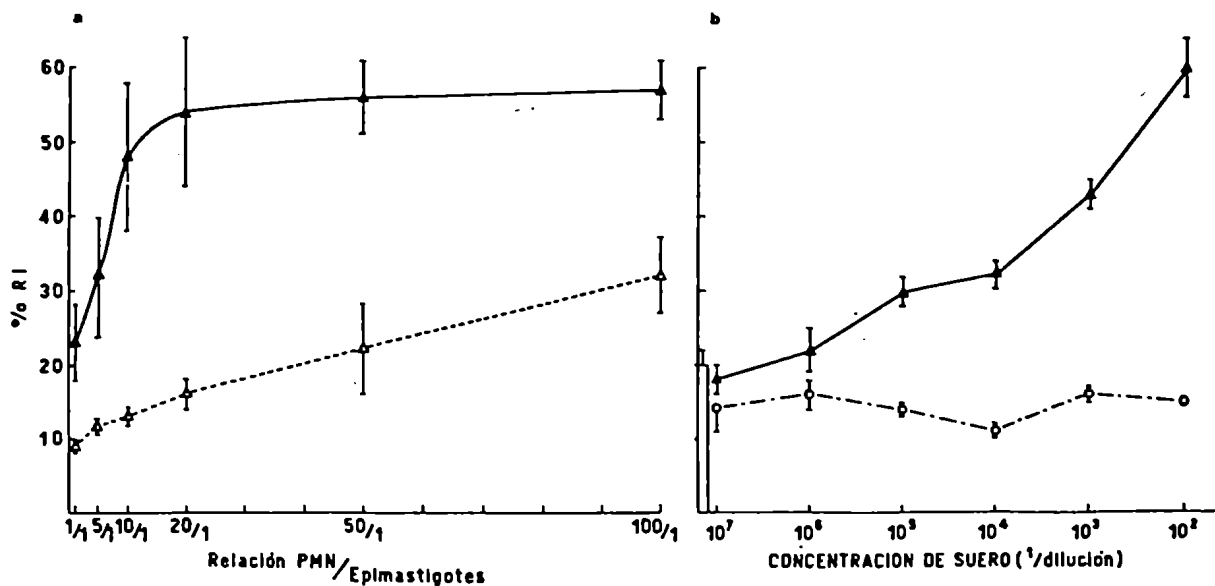


Figura 21: Titulación de suero anti *T. cruzi* y células efectoras

a) Fueron incubadas a 28°C durante 10 minutos diferentes cantidades de PMN con 4×10^4 Epi-³H (▲---▲) o Epi-³H-Ac (▲—▲) sensibilizados con una dilución final 1/200 de suero inmune. Las reacciones fueron hechas por duplicado. Fueron representados los valores promedio (%RI) \pm ES de 2 reacciones.

b) 4×10^5 PMN reaccionaron con 4×10^4 Epi-³H a 28°C durante 10 min en presencia de diferentes diluciones de suero anti-T. cruzi (▲—▲) o suero normal de conejo (○---○).

La reacción fue hecha por duplicado y se determinó el % de RI como se describió en Materiales y Métodos. Se representaron los valores promedio \pm ES. La barra clara en la ordenada representa el % de RI en ausencia de Anticuerpo. El porcentaje de Uridina tritiada que no era liberado de Epi-³H o Epi-³H-Ac después de la lisis por C' era 10 ± 2 ES. Este valor no era descontado del % RI.

III. SECUENCIA DE LA FAGOCITOSIS Y DE LA CITOTOXICIDAD POR LOS LEUCOCITOS PMN HUMANOS.

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió hacer un estudio paralelo que nos permitiese elucidar en una forma precisa el mecanismo de la reacción.

Hasta aquí habíamos demostrado que los leucocitos PMN humanos normales ingerían y destruían epimastigotes de T.cruzi en presencia de anticuerpo anti T.cruzi. Se quiso estudiar, entonces, la relación entre el proceso fagocítico y la actividad citotóxica de las células PMN, utilizando las técnicas descriptas.

1. Cinética de ambas reacciones

Se estudió simultáneamente la cinética de la reacción de fagocitosis y de citotoxicidad, considerándose la radioactividad asociada a los PMN como una medida de la ingestión de parásitos y la radioactividad liberada al sobrenadante como una medida del daño producido.

Los resultados de un experimento representativo (Figura 22) determinan que la fagocitosis de epimastigotes sensibilizados por parte de los leucocitos PMN, era un proceso rápido, que alcanzó un máximo a los 30 min, y además este proceso precedió a la liberación del isótopo al sobrenadante, que comenzó a visualizarse recién cuando la radioactividad asociada a la célula PMN comenzó a disminuir. La liberación de Uridina tritiada al sobrenadante se hizo evidente ya a las 3 horas de incubación, o sea que era un proceso mucho más lento.

Los resultados que se resumen en la Tabla 8 , también confirman que la ingestión de parásitos era anterior a la citólisis. Se observa que el máximo de Uridina-³H asociada a los PMN, se alcanzó a los 30 min, mientras que sólo quedaba un 15% a los 180 minutos; por otro lado el porcentaje de citotoxicidad a estos tiempos fue cero, alcanzando un 57% a los 180 min, este valor sería un 85% del

valor máximo que puede alcanzar la reacción a las 6-7 horas de incubación (Figura 14).

Todo esto sugiere que la mayoría de los epimastigotes fueron destruidos intracelularmente.

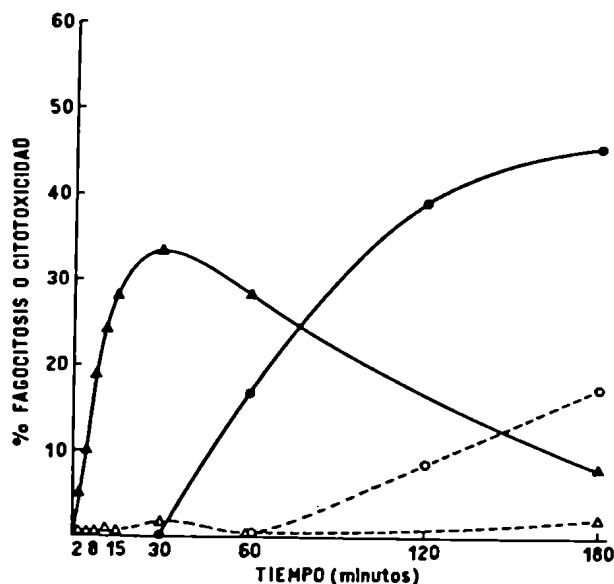


Figura 22: Cinética de Citotoxicidad y Fagocitosis

Se incubaron 4×10^5 leucocitos PMN con 4×10^4 Epi-H o Epi-H-Ac³ (anti-TC), durante 0-180 minutos a 28°C. Los parásitos se pre-sensibilizaron en el tubo de reacción con una dilución final de Ac anti-TC de 1/200, tal como se describió en Materiales y Métodos.

Son graficados los puntos promedio de un experimento hecho por triplicado.

TABLA 8

Secuencia de fagocitosis y citotoxicidad de T.cruzi por leucocitos PMN.

Tiempo de incubación	Fagocitosis (%)			Citotoxicidad (%)		
	$\bar{X} \pm E.S.$			$\bar{X} \pm E.S.$		
	Epi- ³ H-Ac	Epi- ³ H	n	Epi- ³ H-Ac	Epi- ³ H	n
10 min	47 [±] 6	4 [±] 1	10	0	0	3
30 min	55 [±] 6	8 [±] 2	8	0	0	3
180 min	15 [±] 3	4 [±] 1	12	57 [±] 5	13 [±] 3	11

Los leucocitos PMN fueron incubados con epimastigotes marcados con Uridina-³H (Epi-³H) en una relación 10:1 en presencia de suero anti-TC, diluído 1/100. Las reacciones de citotóxicidad y fagocitosis, fueron determinadas después de tiempos variables de incubación.

Los porcentajes de ambas reacciones se calcularon como se describió en Materiales y Métodos.

2. Dependencia de la relación célula efectora/célula blanco y de la concentración de anticuerpo.

Con el fin de determinar los requerimientos óptimos de concentración de Ac y de relación célula efectora/célula blanco, para ambas reacciones, citotoxicidad y fagocitosis, se realizaron experimentos en paralelo. El tiempo de incubación a 28°C para la reacción de fagocitosis fue de 10 minutos y el de la reacción de citotoxicidad fue de 3 hs.

Es importante destacar que a estos tiempos de incubación ninguna de las dos reacciones alcanzó su pico máximo (Ver fig. 14 y Fig 20), no obstante existe una diferencia significativa entre la incorporación y liberación de parásitos marcados y sensibilizados (Epi-³H-Ac) con respecto a los no sensibilizados (Epi-³H).

Los resultados vistos en la Figura 23 indicaron que ambas reacciones presentan un pico máximo en una relación célula efectora/célula blanco de 20:1. Pero también se observa que a relaciones más altas (50:1 y 100:1) aumenta la liberación de ARN o la ingesta de parásitos en ausencia de anticuerpo específico.

En la Figura 24 haciendo el estudio en paralelo, se observa que manteniendo una relación constante de PMK/Epi-³H de 10:1, ambas reacciones dependían en igual medida de la concentración de Ac anti-TC; siendo altamente eficaz ya que a una concentración de $1/10^5$ aún se pudo observar el efecto.

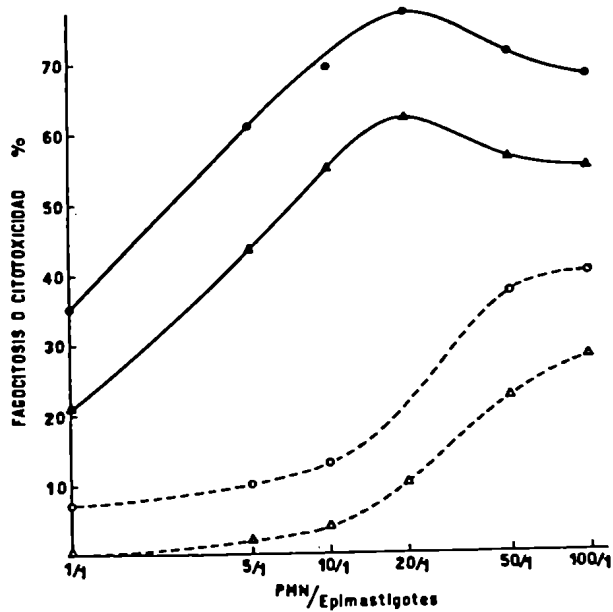


Figura 23: Dependencia de la relación célula efectora: célula -- blanco.

Se incubaron 4×10^4 Epi- ^3H o Epi- ^3H -Ac con diferentes cantidades de leucocitos PMN en la proporción indicada.

Los puntos representados son el promedio de un experimento hecho por duplicado. El porcentaje de Fagocitosis o Citotoxicidad se calculó como se describe en Materiales y Métodos.

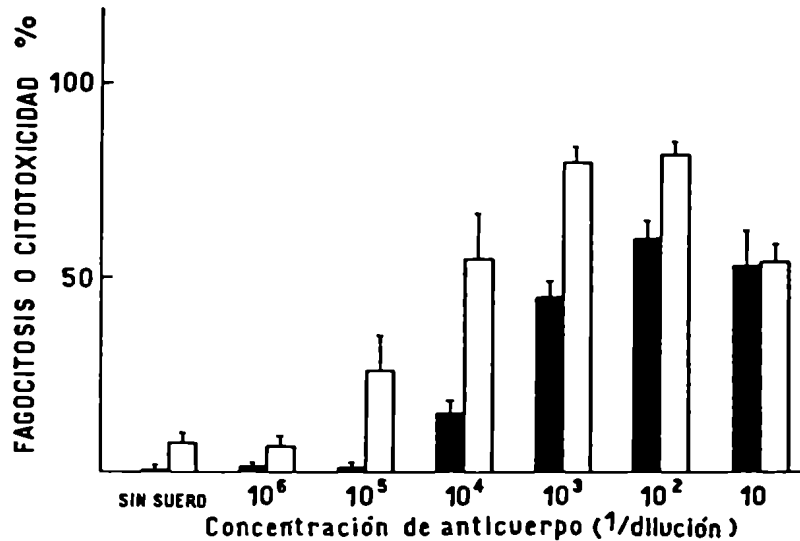


Figura 24 : Dependencia de la concentración de anticuerpo
 Se incubaron 4×10^4 Epi-³H o Epi-³H-Ac con 4×10^5 leucocitos PMN. Se indican las diferentes diluciones de Ac anti-TC con las que se sensibilizó a los parásitos.

Las barras oscuras representan el porcentaje de Fagocitosis y las barras claras el porcentaje de Citotoxicidad.

Las reacciones fueron hechas por duplicado, son graficados los valores promedio \pm E.S. de 4 experimentos.

El porcentaje de Fagocitosis o Citotoxicidad se calculó como se describe en Materiales y Métodos.

3. Liberación de Uridina-³H de los PMN que habían ingerido epimastigotes de T. cruzi

Se estudió la liberación en el transcurso del tiempo de Uridina tritiada al sobrenadante de leucocitos PMN que habían ingerido previamente epimastigotes sensibilizados con Ac anti-TC. -- Así, la reacción de fagocitosis fue interrumpida y los parásitos externos eliminados, de acuerdo al procedimiento usual anteriormente descrito.

La Figura 25 muestra que la liberación del isótopo se hizo, gradualmente, y revela un comportamiento similar a la reacción de citotoxicidad (Figura 14).

El valor promedio de Uridina-³H liberada a las 3 horas de los -- precipitados conteniendo PMN- Epi-³H-Ac fue de 51 ± 10 ($\bar{X} \pm E.S.$, n: 4); sin embargo en el mismo tiempo en la reacción standard de fagocitosis se había liberado un 73% de lo ingerido a los 30 minutos (Tabla 8), es posible que el manipuleo de los PMN para eliminar los parásitos no ingeridos, sea responsable de estas diferencias.

La viabilidad de los leucocitos PMN por la prueba de exclusión de azul Tripán fue superior al 85% durante el tiempo en que se desarrolló la reacción (0-180 min) y después del tratamiento con complemento ó complemento y NEM.

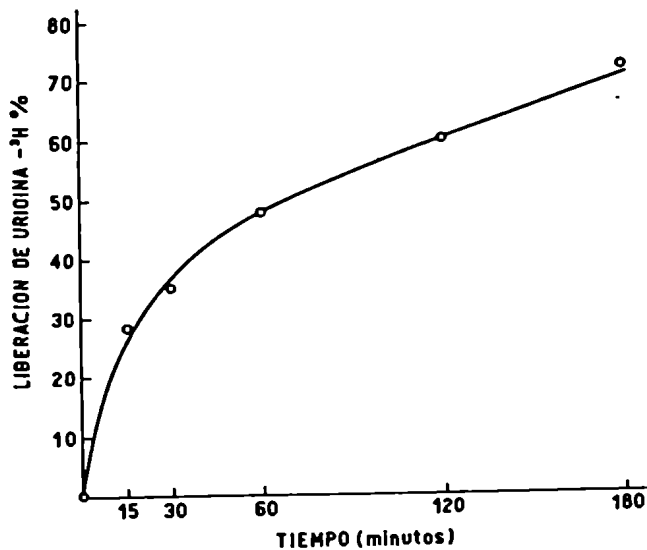


Figura 25: Liberación de Uridina-³H de los PMN que habían ingerido epimastigotes de T.cruzi.

Fueron incubados 4×10^4 epimastigotes de T.cruzi sensibilizados con Ac anti-TC en una dilución final 1/200, con 4×10^5 leucocitos PMN, 30 min a 28°C.

Se calculó el porcentaje de Fagocitosis o Citotoxicidad como se describió en Materiales y Métodos.

Se graficaron los resultados de un experimento representativo, - siendo cada punto experimental el promedio de determinaciones hechas por duplicado.

DISCUSSION

Nuestros resultados indican en primer término que los leucocitos humanos totales de sangre periférica son citotóxicos contra formas de cultivo (epimastigotes) de T.cruzi en presencia de anticuerpo específico anti-TC, ya sea de conejos inmunizados con homogeneizado total de epimastigotes o de suero de pacientes chagásicos crónicos. Luego en un intento por caracterizar la célula efectora, y usando células purificadas por gradientes de Ficoll-Hypaque se demostró que los leucocitos PMN eran los responsables de la reacción citotóxica. Esta población estaba formada por $94 \pm 1\%$ de PMN (neutrófilos y eosinófilos). Los leucocitos mononucleares (LM) en las condiciones usadas y probando diferentes relaciones célula efectora a célula blanco no -- fueron capaces de ejercer efecto citotóxico alguno contra el parásito, ya que los niveles de lisis alcanzados eran similares a los controles; mezclando células PMN y LM en diferente relación, tampoco se observó un efecto aditivo en el porcentaje de lisis producido.

El método utilizado para la evaluación de la reacción citotóxica fue desarrollado previamente por Sanderson y col. (140) fundamentado en observaciones previas (141) sobre incorporación de diversos isótopos radioactivos por las diferentes organelas del parásito, demostrando que el marcaje del ARN con Uridina-³H era el más eficiente.

La CAD era altamente eficaz, ya que como se observa en la Figura 24, aún usando diluciones tan elevadas como $1/10^5$ de suero inmune para sensibilizar los parásitos, se alcanzaron niveles importantes de liberación del isótopo; esto podría tener un significado en las etapas tempranas de la enfermedad, cuando la concentración de Ac es muy baja e insuficiente para que se produzca un efecto directo mediado por complemento.

La reacción citotóxica fue favorecida por el contacto entre

las células efectoras y las células agredidas (Tabla 6) y se inhibió en presencia de γ -globulina agregada (Fig. 18). Las células fueron activas contra los epimastigotes sensibilizados o no previamente con Ac mientras que el pretratamiento de las células efectoras no les confirió actividad. Esto indicaría que la actividad celular sería inducida por la interacción de complejos Ag-Ac formados en la superficie de la célula blanco, con los receptores para el fragmento Fc presentes en las células efectoras.

Nosotros demostramos que la reacción de lisis era dependiente de la concentración de células efectoras y claramente dependiente de Ac ya que no involucró lisis de células blanco no sensibilizadas con Ac (llamadas "células inocentes") lo cual indicaría que no se debe a liberación de sustancias tóxicas por lo menos a gran alcance. Estos resultados son coincidentes con los de Levy y col. (110) y Clark y col. (109) usando sistemas tumorales. Además de esta acción específica, los leucocitos PMN, en ausencia de suero inmune, fueron capaces de producir ciertos niveles de lisis que a tiempos prolongados de incubación y a altas concentraciones de células efectoras (por encima de una relación célula efectora: célula blanco de 20:1) aumentaron en forma significativa. Este fenómeno, fue observado también por otros autores (142). También se observó, que el nivel de citotoxicidad en ausencia de Ac, disminuyó en presencia de γ -globulina agregada, involucrando al receptor Fc.

Lopez y col. (143) demostraron que ambos tipos de granulocitos de rata: neutrófilos y eosinófilos, eran citotóxicos contra formas de cultivo de T. cruzi en presencia de Ac específico. Los eosinófilos en ausencia de Ac, no liberaron casi isótopo, mientras que los neutrófilos provocaron una lisis significativa. Abrahamson y col. (144) demostraron que las células esplénicas de ratón normal indujeron CAD in vitro contra formas de cultivo de T. cruzi tratadas con suero homólogo inmune específico. La depleción de células fagocíticas o adherentes favoreció la ci-

tototoxicidad contra las formas de cultivo, considerando como criterio de citotoxicidad la pérdida de movilidad. Las diferencias con respecto a nuestros resultados pueden ser debidas a diferencias de la citotoxicidad entre especies.

El método de evaluación utilizado por Abrahamson es discutido, ya que el parásito podría perder su movilidad, y no dividirse, pero sin embargo, preservar la integridad de su membrana, en cambio la liberación del ARN macromolecular al sobrenadante, representa en forma indiscutible la destrucción del parásito.

Mkwanzani y col. (145) trabajando con formas de cultivo de T. dionisii marcados con ⁹⁹Tecnecio encontraron que las células linfoides humanas normales eran capaces de lissarlas en presencia de Ac específico. Posteriormente Thorne y col. (142) encontraron que los granulocitos humanos eran citotóxicos contra T. dionisii marcados con ⁹⁹Tecnecio y sensibilizados con Ac, esta reacción fue inhibida por inhibidores de la mieloperoxidasa, sugiriendo que la muerte producida había involucrado la generación y liberación de agentes oxidantes; a diferencia de lo que nos ocurrió con T. cruzi, el T. dionisii podía ser también dañado por células linfoides humanas deplecionadas de células fagocíticas. Las diferencias observadas podrían ser debidas a diferencias entre los parásitos o en la metodología empleada.

En nuestro sistema experimental las preparaciones de células mononucleares eran citotóxicas para otra célula blanco (eritrocito de pollo) sensibilizada con anticuerpo específico hecho en conejo (146), lo cual descartaría una depleción específica de linfocitos "killer" capaces de desarrollar la citotoxicidad dependiente de anticuerpo.

Teniendo en cuenta que los leucocitos PMN son principalmente células fagocíticas y queriendo saber cómo se desarrollaba el mecanismo lítico, y además aprovechando la ventaja de que los parásitos es-

taban marcados con un isótopo radioactivo (Uridina tritiada) se desarrolló un método radioisotópico para medir la fagocitosis, que poseía la ventaja de permitir una evaluación cuantitativa, a diferencia de lo observado por otros autores, que usaban técnicas morfológicas (147). La base de este método consistió fundamentalmente en el hecho de que los parásitos de T.cruzi sensibilizados o no, por el Ac específico, no ingeridos por los leucocitos ya sea libres o adheridos a la célula, eran lisados en forma efectiva por complemento (SHN), mientras que los epimastigotes ingeridos eran inaccesibles a su acción lítica. De este modo, el porcentaje de radioactividad incorporada representó la medida de fagocitosis.

Se observó que los PMN eran capaces de ingerir los parásitos en una fase temprana en presencia de Ac específico, la cual dependía del número de células efectoras y de la concentración de Ac. Se observó también que a tiempos tardíos (180 min) y altas relaciones célula efectora:célula blanco (100:1) los PMN ingerían tanto parásitos sensibilizados como no sensibilizados, sin que la diferencia fuera significativa. Por esta razón se decidió trabajar en una relación 10:1 de célula efectora a célula blanco y durante 10-30 min. de incubación, condiciones en las cuales el método de fagocitosis era altamente sensible.

Thorne y col. (147) trabajando con T.dionisi demostraron que las formas de cultivo eran fagocitadas en presencia o ausencia de Ac específico por neutrófilos y monocitos, mientras que los eosinófilos sólo ingerían en presencia de Ac, y por examen microscópico observaron que el daño dentro de la vacuola fagocítica era muy rápido en los 3 tipos celulares.

Anziano y Dalmaso(148) sugirieron que las células PMN humanas eran capaces de fagocitar epimastigotes sensibilizados. La evalua-

ción fue hecha por un método morfológico, contando el número de células que contenían parásitos de T.cruzi en su interior. El nivel de fagocitosis alcanzado en presencia de suero de pacientes chagásicos crónicos era del 90% y 20-30% en ausencia de anticuerpo, y la cinética era similar a la liberación del isótopo en nuestro sistema.

Sanderson y col. (130) demostraron que los leucocitos PMN (neutrófilos y eosinófilos) y los macrófagos fagocitaban a tripomastigotes de T.cruzi en presencia de Ac. El porcentaje de neutrófilos que habían ingerido los parásitos permaneció constante entre 1-4 horas de incubación. Las diferencias con respecto a nuestros resultados pueden ser atribuidas a diferencias en el método de evaluación y en la proporción de células efectoras a células blanco usada.

Nosotros hicimos el estudio de las reacciones de fagocitosis y citotoxicidad, realizadas en paralelo con los mismos reactivos, con el objeto de establecer la relación entre ambos procesos. Observamos que la cinética de ambas reacciones era diferente. El proceso de ingestión era rápido (15-30 min) disminuyendo con el tiempo el material radioactivo presente dentro del leucocito PMN, mientras que en la reacción de CAD, comenzó a ser notable la lisis (medida por la salida de radioactividad al sobrenadante) a partir de la hora de incubación (Figura 22). En cuanto a la dependencia de la concentración de anticuerpo y de células efectoras, ambas reacciones demostraron tener idénticos requerimientos (Figura 23 y 24). Estos resultados nos indicaron que la fagocitosis y la citotoxicidad de epimastigotes de T.cruzi eran fenómenos estrechamente relacionados.

Estudiamos la liberación de Uridina-³H de los leucocitos PMN que habían previamente fagocitado durante 30 min parásitos sensibilizados. El isótopo liberado correspondía únicamente a los epimastigotes ingeridos, ya que los externos habían sido eliminados por lisis con com-

plemento. Se observó que la cinética de liberación, era similar a la reacción citotóxica. La viabilidad de las células era preservada durante el tiempo de reacción (3 horas), siendo superior al 85%, lo cual nos indicó que el isótopo liberado correspondía a una degradación intracelular del parásito y no a la muerte de la célula efectora. Estos resultados indicaron que la fagocitosis precedía a la liberación de Uridina-³H del interior de los epimastigotes de T.cruzi, en presencia de Ac anti-T.cruzi y leucocitos PMN, pero no fue posible afirmar sin embargo, que la citotoxicidad era una consecuencia del proceso fagocítico, ya que el impacto producido por la célula efectora pudo haber sido temprano, previo a la ingestión. O sea, que en este modelo, los diferentes pasos para producir la lisis de epimastigotes de T.cruzi por los leucocitos PMN serían: adherencia y fagocitosis, degradación intracelular y liberación de los restos celulares al medio extracelular; no podemos decir si la lisis tuvo lugar intracelularmente, extracelularmente o en ambos sitios.

Teniendo en cuenta que ambas formas comparten muchas propiedades biológicas (4) y antígenos de superficie (149), es probable que el efecto citolítico observado pueda ocurrir también con las formas infectivas del parásito. De hecho, se ha observado (150,151) lisis de formas tripomastigote por células mono y PMN humanas y de ratón en presencia de Ac específico.

Los leucocitos neutrófilos y eosinófilos se acumulan alrededor del quiste intracelular formando reacciones inflamatorias, tanto en corazón, como en otros órganos, durante la fase aguda de la Enfermedad de Chagas (8). De esta forma las células PMN, junto con los anticuerpos podrían participar en la destrucción de los parásitos "in vivo", controlando la diseminación de T.cruzi de célula a célula, representando así un papel fundamental en la defensa del huésped.

CONCLUSIONES

- 1- Los leucocitos humanos totales de sangre periférica eran citotóxicos contra formas de cultivo (epimastigotes) de T.cruzi marcados con Uridina-³H en presencia de anticuerpo específico anti-TC, ya sea de conejos inmunizados con homogeneizado total de epimastigotes o de suero de pacientes chagásicos crónicos.
- 2- Haciendo una purificación por gradientes de Ficoll-Hypaque se demostró que los leucocitos PMN (94 1% de neutrófilos y eosinófilos) eran los responsables de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo; mientras que en estas mismas condiciones los linfocitos no fueron capaces de ejercer efecto citotóxico alguno contra el parásito.
- 3- La reacción era claramente dependiente de la concentración de células efectoras y de la concentración de anticuerpo, siendo la liberación del isótopo, progresiva, hasta las 7 horas de incubación, a 28°C.
- 4- La reacción citotóxica fue favorecida por el contacto entre las células efectoras y agredidas, depende de la presencia del receptor para Fc libre ya que se inhibió en presencia de γ -globulina agregada por el calor, y no involucra la lisis de células blanco no sensibilizadas por Ac ("células inocentes").
- 5- Midiendo la radioactividad incorporada a los PMN, se encontró que los parásitos eran fagocitados en una etapa temprana, con un máximo a los 30 minutos, y que dicho fenómeno dependía de la concentración de Ac específico anti-TC y de la concentración de células efectoras.

- 6- Realizando un estudio simultáneo de ambas reacciones, Citotoxicidad y Fagocitosis, se observó que estas tenían idénticos requerimientos, en cuanto a la concentración de Ac y células efectoras utilizadas. Si bien el proceso de Fagocitosis era rápido (15-30 min), la liberación de Uridina-³H al sobrenadante (medida de la reacción citotóxica) era notable recién a la hora de incubación.
- 7- En este modelo experimental la secuencia de la reacción citotóxica parece ser: adherencia y fagocitosis de los parásitos, degradación intracelular y liberación de los restos celulares al medio extracelular.

REFERENCIAS

1. Chagas, C. - Nova entidade morbida do homem. Reimpreso por Brasil Medico 43:3, 1910.
2. Alarcón Segovia, S. y col. - Immunology of Chagas' disease. Bul.WHO 50:459, 1974.
3. Santos-Buch, C.A. - Autoimmunity and Chagas' disease: Demonstration of a common immunogen of heart and Trypanosoma cruzi. Proceeding of Symposium on Organ Specific Autoimmunity, Cremona, Italia, Junio 1977, ed. por Miescher, P.A.
4. Brener, Z. - Biology of Trypanosoma cruzi. Ann. Rev. Microbiol. 27: 347, 1973.
5. Bittencourt, A.L. - Congenital Chagas' disease. Amer. J. Dis. Child. 130:97-103, 1976.
6. Cerisola, J.A., Ravinovich, M., Álvarez, C.A., DiCorleto & Pruneda, J. - Enfermedad de Chagas y la trasfusión de sangre. Bol. Oficina Sanitaria Panamericana 73: 203, 1972.
7. Fife, E.A. - Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. En: Parasitic Protozoa. Vol. I, ed. por Kreier, J.P., Academic Press, 135-73, 1977.
8. Köberle, F. - Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of American Trypanosomiasis. Ad. Parasitol. 6:63, 1968.
9. Tafuri, W.L. - Pathogenetic processes on chagasic enteropathy. En: Resúmenes anuales, Congreso Internacional sobre la enfermedad de Chagas, Rio de Janeiro, Brasil, 1979.
10. Vickerman, K. - Antigenic variation in trypanosomes. Nature 273:613-17, 1978.
11. Brown, K.N. - Protective immunity to malaria provides a model for the survival of cells in an immunologically hostile environment. Nature(London) 230:163, 1971.
12. Mael, J. & Behin, R. - Cell-mediated and humoral immunity to protozoan infections. Transplant. Rev. 19:121-46, 1974.
13. Cohen, S. - The immune response to parasites. En: Symposium on parasites in the immunized host: Mechanisms of Survival, held at the Ciba Foundation London, 13-15, 1973.
14. Fife, Jr, E.J. - Serodiagnosis of Trypanosomiasis. En: Immunology of parasitic infections, ed. , Cohen, S. & Sadum, E. , London, Blackwell, 77-93, 1976.

15. Vattuone, N.H., Szarfman, A. & Gonzalez Cappa, S.M. - Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic trypanosoma infections (Chagas' disease) . J. Trop. Med. Hyg. 76(2): 45-7, 1973.
16. Seah, S. & Marsden, P.D. - The protection of mice against a virulent strain of Trypanosoma cruzi by previous inoculation with an avirulent strain. Ann. trop. Med. Parasitol. 63:211, 1970.
17. Krettli, A.U. & Brener, Z. - Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. J. Immunol. 116:755-60, 1975.
18. Hanson, W.L. - Immunology of American Trypanosomiasis, En: Immunology of parasitic infections, ed. por Cohen, S. & Sadum, E., London, Blackwell, 224-34, 1976.
19. Culbertson, J.T. & Kolodny, M.H. - Acquired immunity in rats against Trypanosoma cruzi. J. Parasitol. 24: 83-90, 1938.
20. Kolodny, M.H. - Studies on age resistance against trypanosome infections. VII. The influence of age upon the immunological response of rats to infection with Trypanosoma cruzi. Amer. J. Hyg. 31:1-8, 1940.
21. Behbehani, M.K. - Trypanosoma(Schizotrypanum)cruzi infections in X-irradiated and in thymectomized mice. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 65:265-6, 1971.
22. Tschudi, E.L., Anziano, D.F. & Dalmaso, A.P. - Lymphocyte transformation in Chagas' disease. Infect. Immunity 6:905-8, 1972.
23. Seah, S. - Delayed hypersensitivity in Trypanosoma cruzi infections. Nature (London) 225:125-7, 1970.
24. Taliaferro, W.H. & Pizzi, T. - Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi. J. infect. Dis. 96:199-226, 1959.
25. Yanovsky, J. & Albado, E. - Humoral and cellular responses to T.cruzi infection. J. Immunol. 109:1159-61, 1972.
26. Goble, F.C. & Boyd, J.L. -.Reticulo-endothelial blockade in experimental Chagas' disease. J. Parasitol. 48:223, 1962.
27. Kierszenbaum, F., Knecht, E., Budzko, D. & Pizzimenti, M.-Phagocytosis: a defense mechanism against infection with Trypanosoma cruzi. J. Immunol. 112:1830-44, 1974.
28. Roberson, E.L., Chapman, W.L. & Hanson, W.L. - The effects of total-X-irradiation on Trypanosoma cruzi infection in mice and rats. Z. Parasitenkd. 41:83, 1973.

29. Roberson, E.L., Hanson, W.L. & Chapman, Jr, W.L. - Trypanosoma cruzi: effects of antithymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. *Exp. Parasitol.* 34:168-80, 1973.
30. Goble, F.C. - Immunity to animal parasites. ed. por Appleton - Century - Crofts, New York, 2:596, 1970.
31. Brener, Z. & Chiari, E. - The effect of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chagas' disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65:629, 1971.
32. González Cappa, S.M., Schmunis, G.A., Traversa, O.C., Yanovsky, J.F. & Parodi, A.S. - Complement fixation test skin test and experimental immunization with antigens of Trypanosoma cruzi prepared under pressure. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* 17:709-15, 1968.
33. Schmunis, G.A., Vattuone, M., Szarfman, A. & Pesce, U.J. - Cell mediated immunity in mice inoculated with epimastigotes or trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. *Z. Tropenmed. Parasit.* 24:81-5, 1973.
34. Roberson, E.L. & Hanson, W.L. - Transfer of immunity to Trypanosoma cruzi. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.* 68:338, 1974.
35. Alcantara, A. & Brener, Z. - The in vitro interaction of Trypanosoma cruzi blood-stream forms and mouse peritoneal macrophages. *Acta tropica* 35:209-19, 1978.
36. Kipnis, T., Calich, V.L.G. & Dias da Silva, V. - Active entry of bloodstream forms of Trypanosoma cruzi in macrophages. *Parasitology* 80:139-45, 1980.
37. Milder, R. & Kloetzel, J. - The development of Trypanosoma cruzi in macrophages in vitro. Interaction with lysosomes and host cell fate. *Parasitology* 80:139-45, 1980.
38. Nogueira, N. & Cohn, Z. - Trypanosoma cruzi: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 143: , 1976.
39. Nogueira, N. & Cohn, Z. - Trypanosoma cruzi: in vitro induction of macrophage microbicidal activity. *J. Exp. Med.* 148:228-300, 1978.
40. Nogueira, N., Gordon, S. & Cohn, Z. - Trypanosoma cruzi: modification on macrophage function during infection. *J. Exp. Med.* 146:157-71, 1977.
41. Cossio, P.M., Diez, C., Szarfman, A., Kreutzer, E., Candiolo, B. & Arana, R. - Chagasic Cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* XLIX:13-21, 1974.

42. Cossio, P.M., Laguens, R.P., Diez, C., Szarfman, A., Segal, A. & Arana, R. - Chagasic Cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation* 50: 1252-59, 1974.
43. Khoury, E.L., Ritacco, V., Cossio, P.M., Laguens, R.P., Szarfman, A., Diez, C. & Arana, R. - Circulating antibodies to peripheral nerve in American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.* 36: 8-15, 1979.
44. Govaerts, A. - Cellular antibodies in kidney hemotransplantation. *J. Immunol.* 85:516-22, 1960.
45. Cerottini, J.C. & Brunner, K.T. - Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection, and tumor immunity. *Adv. Immunology* 18:67-132, 1974.
46. Oldham, R.K., Siwarski, D., McCoy, J.L., Plata, E.J. & Herbermann, R.B. - Evaluation of a cell-mediated cytotoxicity assay utilizing Iododeoxyuridine-labelled tissue-culture target cells. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 37:49, 1973.
47. Rosemberg, E.B., McCoy, J.L., Gree, S.S., Donnelly, F.C., Siwarski, D.F., Levine, P.H. and Herbermann, R.B. - Destruction of human lymphoid tissue culture cell lines by human peripheral lymphocytes in ⁵¹Cr-release cellular cytotoxicity assays. *J. Natl. Cancer Inst.* 52:345, 1974.
48. Herbermann, R.B., Djen, J.Y., Kay, H.D., Ortaldo, J.R., Riccardi, C., Bonnard, G.D., Hoden, H.T., Fagnani, R., Santoni, A. & Puccetti, P. - Natural killer cells: Characteristics and regulation of activity. *Immunological Reviews* 44:43-70, 1979.
49. Territo, M.C. & Cline, M.J. - Monocyte function in man. *J. Immunol.* 118(1);1977.
50. Van Furth, R., Van Zwet, T.L. & Leijh, P.C.J. - In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. En: *Handbook of Experimental Immunology*, ed. por Weir, D.M., Cap. 32, pág. 32.1-9, 1978.
51. Edelson, P.J. & Cohn, Z.A. - Purification and cultivation of monocytes and macrophages. En: *In vitro methods in cell-mediated and tumor immunity*, ed. por Bloom, B.R. & David, J.R., Academic Press, New York, Cap. 26, pág.333, 1976.
52. Perlmann, P. & Holm, G. - Cytotoxic effect of lymphoid cells. *Adv. Immunol.* 11:117-181, 1969.
53. Mac Lennan, I.C.M. - Antibody in the induction and inhibition of lymphocyte cytotoxicity. *Transplant. Rev.* 13:67-90, 1972.

54. Perlmann, P., Perlmann, H. & Wigzell, H. - Lymphocyte mediated cytotoxicity in vitro induction and inhibition by humoral antibody and nature of effector cells. *Transplant. Rev.* 13:91-114, 1972.
55. Perlmann, P. & Perlmann, H. - Contactual lysis of antibody-coated chicken erythrocytes by purified lymphocytes. *Cell. Immunol.* 1:300-15,
56. Lundsgren, G., Collste, L. & Möller, G. - Cytotoxicity of human lymphocytes:antagonism between inducing processes. *Nature(London)*220: 289-91, 1968.
57. Mac Lennan, I.C.M. & Loewi, G. - The effect of specific antibody to target cells on their specific and non-specific interactions with *Nature(London)* 219:1069-70, 1968.
58. Gelfand, E.W., Resch, K. & Prester, M. - Antibody-mediated target cell-lysis by non-immune cells. Characterization of the antibody and effector cell populations. *Eur. J. Immunol.* 2:419-24, 1972.
59. Scornik, J.C., Cosenza, H., Lee, W., Kohler, H. & Rowley, D.A. - Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity. I. Differentiation from antibody-independent cytotoxicity by normal IgG. *J. Immunol.* 113(5):1510-18, 1974.
60. Mac Lennan, I.C.M., Loewi, G. & Harding, B. - The role of immunoglobulins in lymphocyte mediated cell damage in vitro. I. Comparison of the effects of target cell specific antibody and normal serum factors on cellular damage by immune and non immune lymphocytes. *Immunology* 18:397-404, 1970.
61. Isturiz, M.A., Bracco, M.M.E.de, Pizzi, A.M. & Manni, J.A.-Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in rheumatoid arthritis.Effect of rheumatoid serum fraction on normal lymphocytes. *Arthritis Rheum.* 19(4):725-30, 1976.
62. Van Boxel, J.A., Paul, W.E., Green, I. & Frank, M.M. - Antibody-dependent lymphoid cell-mediated cytotoxicity: role of complement. *J. Immunol.* 112(1):398-403, 1974.
63. Wisloff, F., Michaelsen, E.T. & Froland, S.S. - Inhibition of antibody-dependent human lymphocyte-mediated cytotoxicity by immunoglobulin classes IgG, subclasses and IgG fragments. *Scand. J. Immunol.* 3:29-38, 1974.
64. Larsson, A. & Ohlander, C. - In vitro target cell lysis mediated by normal human lymphocytes (K cells) or monocytes. Induction with guinea pig IgG1 and IgG2 antibodies. *Scand. J. Immunol.* 4:769, 1975.

65. Van Boxel, J.A., Paul, W.E., Frank, M.M. & Gree, I. - Antibody-dependent lymphoid cell-mediated cytotoxicity: role of lymphocytes bearing a receptor for complement. *J. Immunol.* 110:1027-36, 1973.
66. Greenberg, A.H. & Shen, L. - Class of specific cytotoxic cells demonstrated in vitro by arming with antigen-antibody complexes. *Nature(New Biology)* 245:282-85, 1973.
67. Jewell, D.P. & Mac Lennan, I.C.M. - Circulating immune complexes in inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* 14:219-26, 1973.
68. Mikulski, S. & Billing, R. - Inhibition of lymphocyte-dependent antibody effector cell function by human anti-B lymphocyte allo-antiserum. *Cell. Immunol.* 28:69-74, 1977.
69. Austin, R. & Daniels, C.A. - Inhibition by rheumatoid factor, anti-Fc, and staphylococcal protein A of antibody-dependent cell mediated cytolysis against Herpes simplex virus-infected cells. *J. Immunol.* 117(2):602-7, 1976.
70. Strom, T.B., Garovoy, M.R., Bear, R.A., Gribik, M. & Carpenter, C.B. - A comparison of the effects of metabolic inhibitors upon direct and antibody-dependent lymphocyte mediated cytotoxicity. *Cell. Immunol.* 20:247-56, 1975.
71. Calder, E.A., Urbaniak, S.J., Penhale, W.J. & Irvine, W.J. Characterization of human lymphoid cell-mediated antibody-dependent cytotoxicity (LDAC). *Clin. Exp. Immunol.* 18:579-93, 1974.
72. Moller, G. & Svehag, S.E. - Specificity of lymphocyte mediated cytotoxicity induced by in vitro antibody-coated target cells. *Cell. Immunol.* 4:1-19, 1972.
73. Wunderlich, J.R., Rosenberg, E.B. & Connaly, J.M. - Human lymphocyte-dependent cytotoxic antibody and mechanisms of target cell destruction in vitro. In: *Progress in Immunology*, ed. por Amor, B., New York, Academic Press, 473-86, 1971.
74. Isturiz, M.A. & Cardoni, R.L. - The role of protein synthesis in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Cell. Immunol.* 31:332-39, 1977.
75. Holm, G., Perlmann, P. & Werner, B. - Phytohemagglutinin-induced cytotoxic action of normal lymphoid cells in tissue culture. *Nature* 203:841, 1964.
76. Simchowitz, L. & Schur, P.H. - Lectin-dependent neutrophil-mediated cytotoxicity I. Characteristics. *Immunology* 31:303-11, 1976.
77. Simchowitz, L. & Schur, P.H. - Lectin-dependent neutrophil-mediated cytotoxicity. II. Possible Mechanisms. *Immunology* 31:313-22, 1976.

78. Bracco, M.M.E.de, Isturiz, M.A. & Manni, J.A., - Cell-mediated cytotoxicity. Characterization of the effector cells. *Immunology* 30: 325, 1976.
79. Nelson, D.L., Bundy, B.M., Pitchon, H.E., Blaese, R.M. & Strober, W. The effector cells in human peripheral blood mediating mitogen-induced cellular cytotoxicity and antibody dependent cellular cytotoxicity. *J. Immunol.* 117:1472, 1976.
80. Lo Buglio, A., Cotran, R. & Jandl, J. - Red cells coated with immunoglobulin G: binding and sphering by mononuclear cells in man. *Science* 158:1582, 1967.
81. Lay, W.H. & Nussenzweig, V. - Receptors for complement on leukocytes. *J. Exp. Med.* 128:991-1010, 1968.
82. Mantovani, B., Ravinovich, M. & Nussenzweig, V. - Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different roles of the macrophage receptor sites for complement (C₃) and for immunoglobulin (IgG). *J. Exp. Med.* 135:780-92, 1972.
83. Henson, P.N. - The adherence of leukocytes and platelets induced by fixed IgG antibody or complement. *Immunology* 107:106, 1969.
84. Mantovani, B. - Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 115(1):15-7, 1975.
85. Scribner, D.J. & Fahrney, D. - Neutrophil receptors for IgG and complement: their roles in the attachment and ingestion phases of phagocytosis. *J. Immunol.* 116(4):892-97, 1976.
86. Ehlenberger, A.G. & Nussenzweig, V. - The role of membrane receptors for C_{3b} and C_{3d} in phagocytosis. *J. Exp. Med.* 145:357-71, 1977.
87. Newman, S.L. & Johnston, Jr, R.B. - Role of binding through C_{3b} and IgG in polymorphonuclear neutrophil function: studies with trypsin-generated C_{3b}. *J. Immunol.* 123:1839, 1979.
88. Mac Donald, H.R., Bonnard, H.R., Sordat & Zawodnik, S.A. - Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: Heterogeneity of effector cells in human peripheral blood. *Scand. J. Immunol.* 4:487, 1975.
89. Hunninghake, G.W. & Fauci, A.S. - Quantitative and qualitative effects of cyclophosphamide administration on circulating polymorphonuclear leukocytes. *Immunology* 31:139, 1976.
90. Zeijlemaker, W.P., Roos, M.T., Schellekens, P.T.A. & Eijssvoogel, V.P. Antibody-dependent human lymphocytotoxicity: A micro assay system. *Eur. J. Immunol.* 5:579, 1975.
91. Trinchieri, G., Bauman, P., de Marchi, M. & Tökes, Z. - Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in humans. I. Characterization of the effector cell. *J. Immunol.* 115: 249, 1975.

92. Henson, P. - The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The role of antibody and complement on non-phagocytosable particles. *J. Immunol.* 107:1535-46, 1971.
93. Henson, P. - The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. II. Mechanisms of release during phagocytosis and adherence to nonphagocytosable surfaces. *J. Immunol.* 107:1547-57, 1971.
94. Smolen, J.D. & Weissman, G. - The granulocyte: metabolic properties and mechanisms of lysosomal enzyme release. En: *Neutral Proteases of human polymorphonuclear leukocytes*, ed. por Haveman, K. & Janoff, A. 56-76, 1978.
95. Goldstein, I.M., Hoffstein, S.T. & Weissman, G. - Mechanisms of lysosomal enzyme release from human polymorphonuclear leukocytes. Effects of phorbol myristate acetate. *J. Cell. Biol.* 66:647-52, 1975.
96. Nathan, C.F., Brukner, L.H., Silverstein, S.C. & Cohn, Z.A. Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. I. Pharmacologic triggering of effector cells and the release of Hydrogen Peroxide. *J. Exp. Med.* 149:84-99, 1978.
97. Hoffstein, S.T., Soberman, R., Goldstein, I.M. & Weissman, G. - Concanavalin A induces microtubule assembly and specific granule discharge in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell. Biol.* 68: 781-87, 1976.
98. Goldstein, I.M., Hoffstein, S.T. & Weissman, G. - Influence of divalent cations upon complement mediated enzyme release from human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 115:665, 1975.
99. Sbarra, A.J. & Karnovsky, M.L. - The biochemical of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 234:1355-62, 1959.
100. Babior, B.M., Kipnis, R.S. & Curnutte, J.T. - Biological Defense Mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 52: 741, 1973.
101. Iyer, G.I.N., Islam, F.M. & Quastel, J.H. - Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature* 192:535, 1961.
102. Babior, B.M. - Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.* 298(12):659-725, 1978.
103. Weiss, S.J., Rustagi, P.K. & LoBuglio, A.F. - Human granulocyte generation of hydroxyl radical. *J. Exp. Med.* 147:316-23, 1978.
104. Nathan, C.F., Silverstein, S.C., Brukner, L.H. & Cohn, Z.A. Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen Peroxide as a mediator of cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 149: 100-113, 1978.
105. Klebanoff, S.J. - Iodination of bacteria: A bactericidal mechanism. *J. Exp. Med.* 126:1063-78, 1967.

106. Ryan, G.B. & Majno, G. - Defects of Leukocytic Function. En: Inflammation ed. Thomas, B.A. The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, 38-40, 1977.
107. Gale, R.P. & Zigelboim, J. - Polymorphonuclear leukocytes in antibody dependent cellular cytotoxicity. J. Immunol. 114:1047-51, 1975.
108. Zigelboim, J., Gale, R.P. & Kedar, E. - Polymorphonuclear leukocyte Fc receptors in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Transplantation 21:6, 1976.
109. Clark, R. & Klebanoff, S. - Studies on the mechanism of antibody-dependent polymorphonuclear leukocyte-mediated cytotoxicity. J. Immunol. 119(4):1413-18, 1977.
110. Levy, P., Shaw, G. & LoBuglio, A. - Human monocyte, lymphocyte and granulocyte antibody dependent cell mediated cytotoxicity toward tumor cells. I. General characteristics of cytotoxicity. J. Immunol. 123(2):594, 1979.
111. Hafeman, D.F. & Lucas, Z.J. - Polymorphonuclear leukocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against tumor cells: dependence on oxygen and the respiratory burst. J. Immunol. 123(1):55-62, 1979.
112. Dvorak, A.M., Connell, A.B., Proppe, K. & Dvorak, H.F. - Immunologic rejection of mammary adenocarcinoma (TA-3-St) in C57Bl/6 mice: participation of neutrophils and activated macrophages with fibrin formation. J. Immunol. 120(4):1240-48, 1978.
113. Wardley, R., Babiuk, L. & Rouse, B. - Polymorph-mediated antibody-dependent cytotoxicity-modulation of activity by drugs and immune interferon. Can. Jour. of Microb. 22(9):1222-28, 1976.
114. Oleske, J.M., Ashman, R.B., Kohl, S., Shore, S.L., Starr, S.E., Woods, P. & Nahmias, A.J. - Human polymorphonuclear leukocytes as mediators of antibody-dependent cellular cytotoxicity to herpes simplex virus-infected cells. Clin. Exp. Immunol. 27:446-53, 1977.
115. Ziegler, H.K. & Henney, C.S. - Antibody-dependent cytolytically active human leukocytes: an analysis of inactivation following in vitro interaction with antibody coated target cells. J. Immunol. 115:1500, 1975.
116. Grewal, A., Rouse, B. & Babiuk, L. - Mechanisms of resistance to herpes viruses: Comparison of the effectiveness of different cell types in mediating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Infect. Immunity 15(3):698-703, 1977.
117. Siebens, H., Tevethia, S. & Babor, B. - Neutrophil-mediated antibody dependent killing of Herpes-Simplex-Virus-infected cells. Blood 54(1):88, 1979.
118. Rouse, B., Wardley, R. & Babiuk, L. - Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity in cows: comparison of effector cell activity against heterologous erythrocyte and herpes virus-infected bovine target cells. Infect. Immunity 13:5, 1976.

19. Holm, G. - Lysis of antibody-treated human erythrocytes by human leukocytes and macrophages in tissue culture. *Int. Arch. Allergy* 43: 671-82, 1972.
20. Katz, P., Simone, C., Henkart, P. & Fauci, A. - Mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity. The use of effector cells from chronic granulomatous disease patients as investigative probes. *J. Clin. Invest.* 65:55-63, 1980.
21. David, J., Butterworth, A., Renold, H., David, P., Houba, V. & Sturrok, R. - Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ⁵¹Cr-labelled schistosomula of Schistosoma mansoni: Effect of metabolic inhibitors and other which alter cell function. *J. Immunol.* 118(6): 2221-29, 1977.
22. Butterworth, A., Vadas, M., Wasson, D., Dessen, A., Hogan, M., Sherrg, D., Gleich, G. & David, J. - Interactions between human eosinophils and schistosomula of Schistosoma mansoni II. The mechanism of irreversible eosinophil adherence. *J. Exp. Med.* 150(6): 1456, 1979.
23. Stossel, T.P., Field, R.J., Gitlin, J.D., Alper, C.A. & Rosen, F.C. - The opsonic fragment of the third component of human complement (C₃). *J. Exp. Med.* 141:1329, 1975.
24. Bianco, C., Griffin, Jr, F.M. & Silverstein, S.C. - Studies on the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. *J. Exp. Med.* 141:1273, 1975.
25. Silverstein, S.C. - Endocytic uptake of particles by mononuclear phagocytes and the penetration of obligate intracellular parasites. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* 26(6):161, 1977.
26. Michl, J. & Silverstein, S.C. - Role of macrophage receptors in the ingestion phase of phagocytosis. Birth Original Article Series, XIV(2): 99-117, 1978. The National Foundation.
27. Baker, J.R. & Liston, A.J. - Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii : Effect of various agents on attachment and entry to macrophages in vitro and on morphogenesis. *J. of General Microbiology* 104:79-89, 1978.
28. Williams, D.M. & Remington, J.S. - Effect of human monocytes and macrophages on Trypanosoma cruzi. *Immunology* 32:19, 1977.
29. Nathan, C., Nogueira, N., Juangbhanich, C., Ellis, J. & Cohn, Z. - Activation of macrophages in vivo and in vitro: correlation between hydrogen peroxide release and killing of Trypanosoma cruzi. *J. Exp. Med.* 149(5):1056, 1979.
30. Sanderson, C.J. & De Souza, w. - A morphological study of the action between Trypanosoma cruzi and rat eosinophils, neutrophils and macrophages "in vitro". *J. Cell. Sci.* 37:275-86, 1979.
31. Sanderson, C.J. & Thomas, J. - A comparison of the cytotoxic activity of eosinophils and other cells by ⁵¹Chromium release and time lapse micro-cinematography. *Immunology* 34:771, 1978.

132. Segura, E.L., Cura, E.N., Paulone, I., Vásquez, C. & Cerisola, J.A.- Antigenic makeup of subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. J. Protozool. 21:571, 1974.
133. Böyum, A.- Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21(Supl. 97):77, 1968.
134. Anziano, D.F., Dalmasso, A.P., Leichuk, R. & Vásquez, C. - Role of complement immune lysis of Trypanosoma cruzi. Infect. Immunity 6:860, 1972.
135. Lowry, O.H., Rosebrough, N.H., Farr, A.L. & Randall, R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193:265-75, 1959.
136. Cerisola, J.A., Fatała Chaben, M. & Lazzari, J.O. - Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Prensa Med. Argentina 49:1761, 1962.
137. Cerisola, J.A. & Rosenbaum, M.B. - La reacción de fijación del complemento para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. I. Técnica. Prensa Med. Argentina 45:1454, 1958.
138. Álvarez, M., Cerisola, J.A. & Rohwedder, R.W.R. Boletín Chileno de Parasitología 23:4, 1963.
139. Vattuone, N.H. & Yanovsky, J.F. - Agglutination activity of enzyme-treated epimastigotes. Exp. Parasitol. 30:349, 1971.
140. Sanderson, C.J., Bunn Moreno, M.M. & López, A.F. - Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity of Trypanosoma cruzi: the release of tritium-labelled RNA, DNA and protein. Parasitol. 76:299, 1978.
141. Fernandez, J.F., Castellani, O. & Kimura, E. - Physiological events in the course of growth and differentiation of Trypanosoma cruzi. Genet. Suppl. 61:213, 1969.
142. Thorne, K.L.I., Svvennsen, R.J. & Franks, D. - Role of hydrogen peroxide and peroxidase in the cytotoxicity of Trypanosoma dionisii by human granulocytes. Infect. Immunity 21:798, 1978.
143. Lopez, A., Bunn Moreno, M. & Sanderson, C.J. - The lysis of Trypanosoma cruzi epimastigotes by eosinophils and neutrophils. Int. J. for Parasitology 8:485-89, 1978.
144. Abrahamsohn, I.A. & Da Silva, W.D. - Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity against Trypanosoma cruzi. Parasitol. 75:317, 1977.
145. Mkwanzani, J.B., Franks, D. & Baker, J.R. - Cytotoxicity of antibody-coated trypanosomes by normal human lymphoid cells. Nature(London) 259:403-4, 1976.
146. Manni, J.A., Bracco, M.M.E. de & Patrucco, A. - Citotoxicidad de linfocitos en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Medicina (Bs As) 34:185, 1974.

147. Thorne, K.J.I., Glauert, A.M., Svvennsen, R.J. & Franks, D. - Phagocytosis and killing of Trypanosoma dionisii by human neutrophils, eosinophils and monocytes. Parasitology 79(3):367, 1979.
148. Anziano, D.F. & Dalmasso, A.P. - Participación de factores séricos en la fagocitosis de formas de cultivo del Trypanosoma cruzi. Medicina 27:396, 1967.
149. Kloetzel, J., Camargo, M.E. & Giovannini, V.L.- Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and tripomastigotes of Trypanosoma cruzi. J. Protozool. 22:259, 1975.
150. Kierszenbaum, F. - Antibody-dependent killing of bloodstream forms of Trypanosoma cruzi by human peripheral blood leukocytes. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 28:965-9, 1979.
151. Kierszenbaum, F. & Hayes, M.M. - Mechanisms of resistance against experimental Trypanosoma cruzi infection. Requirements for cellular destruction of circulating forms of Trypanosoma cruzi in humans and murine in vitro systems. Immunology 40:61-66, 1980.

Publicaciones parciales del trabajo realizado y presentado en esta tesis.

Olabuenaga, S.E., Cardoni, R.L., Segura, E.L., Riera, N.E. & Bracco, M.M.E. de. Antibody-dependent cytolysis of Trypanosoma cruzi by human polymorphonuclear leukocytes. Cell. Immunol. 44: 85-93, 1979.

Cardoni, R.L., Olabuenaga, S.E., Riera, N.E. & Bracco, M.M.E. de. Mecanismos inmunológicos efectores en la infección con Trypanosoma cruzi. Actividad citotóxica dependiente de anticuerpo de los leucocitos polimorfonucleares humanos. Medicina (Bs As) 40 (Supl. 1):77-84, 1980.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mi Directora de Tesis, la Dra. María Marta de E. de Bracco, quien con su apoyo constante ha permitido la realización de esta tesis.

A las Dras. M.T.Rimoldi, N.E.Riera y R.L.Cardoni les agradezco su importante y valiosa colaboración científica en el trabajo presentado.

Agradezco a la Dra. Ana María Brunengo el haber dedicado parte de su tiempo, para leer esta tesis, aportándome su valioso consejo y su reconocida opinión.

Agradezco a la Dra. E.Segura y al Dr R. Docampo el habernos facilitado las formas de cultivo de T.cruzi, así como sus valiosos consejos sobre las condiciones de cultivo.

Agradezco al equipo de investigadores del CEMIC que dirige el Dr. P.Cossio, el haber realizado el estudio serológico de los pacientes chagásicos crónicos y el habernos facilitado gentilmente esos sueros.

Susana Okunevsky

W. Bracco