

Tesis de Posgrado

Efecto de la ciclofosfamida sobre sistemas inmunes citotóxicos

Giordano, Mirta Nilda

1983

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:

Giordano, Mirta Nilda. (1983). Efecto de la ciclofosfamida sobre sistemas inmunes citotóxicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1793_Giordano.pdf

Cita tipo Chicago:

Giordano, Mirta Nilda. "Efecto de la ciclofosfamida sobre sistemas inmunes citotóxicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1793_Giordano.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

EFEECTO DE LA CICLOFOSFAMIDA SOBRE SISTEMAS INMUNES CITOTOXICOS

Autora: Mirta Nilda Giordano

Directora: Dra. María Marta de Elizalde de Bracco

Lugar de trabajo: Sección Inmunohematología

Instituto de Investigaciones Hematológicas

Academia Nacional de Medicina

Tesis presentada para optar al título de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Buenos Aires 1983

J793
Ej. 2

A mi familia

Agradecimientos:

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Martín Isturiz cuya capacidad científica y su entusiasmo permanente han influenciado decididamente en mí, afianzando mi vocación por la investigación y transformando el trabajo diario en la más agradable de las tareas. Sin su inestimable aporte no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

Agradezco a la Dra. María Marta de Elizalde de Bracco la confianza que depositó en mí al recibirme en la Sección Inmunología del Instituto de Investigaciones Médicas, posibilitando la continuación de mi carrera científica. Su estímulo y dedicación fueron fundamentales para que se lleve a cabo este trabajo.

Agradezco a todos mis compañeros del Instituto de Investigaciones Hematológicas, técnicos y profesionales, que me acompañaron y estimularon constantemente en mi tarea.

Agradezco a la Dra. Marta Braun, con quien me inicié en el estudio de la Inmunología, el entusiasmo que supo contagiarme en aquellos primeros años de labor.

Finalmente, quiero agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) el apoyo económico brindado a través de las becas con que me distinguió.

INTRODUCCION	1
Mecanismos inmunológicos de defensa	3
Sistemas humorales de defensa	4
Sistemas celulares de defensa	
a) Citotoxicidad directa	5
b) Citotoxicidad natural	6
Sistemas combinados de defensa	
a) Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)	7
b) Fagocitosis específica	13
Ciclofosfamida	19
Metabolismo	20
Acción de la ciclofosfamida sobre el tejido linfoide	20
Acción de la ciclofosfamida sobre las respuestas inmunes	
* Respuesta humoral	23
* Respuesta celular	
a) Hipersensibilidad retardada	24
b) Rechazo de injertos	26
c) Reacción de injerto contra huésped .	27
* Tolerancia inmunológica	28

MATERIALES Y METODOS

a) Medio de cultivo	30
b) Solución de Turk para conteo de leucocitos .	30
c) Prueba de viabilidad celular	30
d) Solución de Ficoll-Hypaque	30
e) Lisis de eritrocitos	31
f) Animales	31
g) Tratamiento de los animales	
g-1) Con ciclofosfamida	32
g-2) Con tioglicolato	32
h) Obtención de las células efectoras en CCDA	
h-1) Suspensiones de bazo, ganglios y timo	32
h-2) Separación de leucocitos mononucleares y polimorfonucleares de sangre periférica	33
i) Marcación de eritrocitos con cromato de sodio radioactivo	34
j) Preparación del suero anti-eritrocitos de pollo	35
k) Reacción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)	35

1) Formación de rosetas EA	36
1l) Respuesta de producción de anticuerpos	37
m) Respuesta de hipersensibilidad retardada	38
n) Obtención de las células del exudado peritoneal .	39
ñ) Preparación del suero anti-eritrocitos de carnero	39
o) Preparación de complejos eritrocitos de carnero-anticuerpo	39
p) Reacción de fagocitosis específica	
p-1) In vitro	40
p-2) In vivo	41

RESULTADOS

I- Acción de la ciclofosfamida sobre la citotoxicidad

celular dependiente de anticuerpos (CCDA)	42
1) Dependencia de la dosis	43
2) Cinética de la reacción	46
3) Sensibilización de los eritrocitos de pollo con distintas cantidades de anticuerpos	48
4) Relación entre el número de esplenocitos totales y los que expresan RFc γ	50
5) Duración del efecto de una única dosis de ciclofosfamida sobre la CCDA	50
6) Efecto de la ciclofosfamida sobre la CCDA mediada por células no esplénicas	53
7) Efecto de la ciclofosfamida sobre la respuesta primaria de anticuerpos y la hipersensibilidad retardada	57

II- Acción de la ciclofosfamida sobre la fagocitosis

1) Sensibilización de los glóbulos rojos de carnero con distintas cantidades de anticuerpos	59
2) Duración del efecto de una única dosis de ciclofosfamida sobre la fagocitosis específica .	63
3) Fagocitosis "in vivo"	63
4) Acción del tioglicolato sobre la fagocitosis y la CCDA	66

DISCUSION 69

RESUMEN 80

BIBLIOGRAFIA 82

INTRODUCCION

Los vertebrados poseen un sistema inmune extremadamente complejo que les permite sobrevivir en un medio poblado de agentes infecciosos. Cuando los mecanismos inespecíficos de defensa como la capacidad bactericida de los sueros y la fagocitosis, son insuficientes para detener la invasión de gérmenes, el individuo se defiende poniendo en marcha una serie de mecanismos efectores específicos. Algunos de estos involucran la participación directa de las células en la eliminación del agente patógeno. Estos sistemas celulares de defensa comprenden: la citotoxicidad mediada por linfocitos T específicamente sensibilizados (1), la citotoxicidad natural (2), la fagocitosis específica (3) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) (4). Los dos mecanismos indicados en primer término han sido ampliamente estudiados en cuanto a su regulación por otras células del sistema inmune. Por el contrario, es muy poco lo que se conoce sobre el control inmunológico de la CCDA y la fagocitosis. Sin embargo, es lógico pensar que también para estas respuestas existan mecanismos de regulación capaces de suprimirlas o amplificarlas.

Numerosas sustancias químicas pueden alterar el delicado equilibrio en que se encuentra el sistema inmune. Muchas de éstas son utilizadas comúnmente en el tratamiento del cancer y de pacientes con alteraciones inmunológicas, siendo la ciclofosfamida (Cf) una de las más corrientes (5,6). Se trata de un agente alquilante derivado de la mostaza nitrogenada que ejerce su acción citotóxica principalmente sobre células que se hallan en proliferación activa (7). Además de su importancia terapéutica, la Cf ha sido una herramienta valiosa para estudiar las interacciones celulares de las dis-

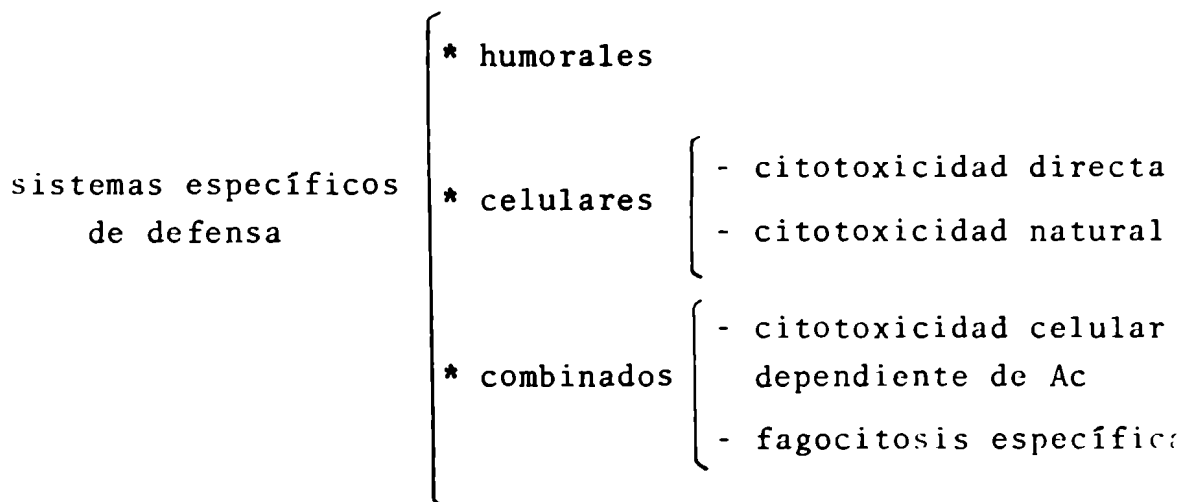
tintas poblaciones que componen el sistema inmune, ya que éstas poseen diferente sensibilidad a la droga (8). Por ejemplo, es posible suprimir o exacerbar las respuestas de síntesis de anticuerpos y de hipersensibilidad retardada variando la dosis de Cf o el momento en que se inyecta con relación a la inmunización (9,10).

El objetivo del trabajo presentado en esta tesis fue investigar, en forma comparativa, el efecto que ejerce la Cf sobre una serie de reacciones inmunológicas, en particular la CCDA y la fagocitosis específica. El trabajo experimental se realizó utilizando ratones endocriados de la cepa BALB/c. Los resultados obtenidos demuestran que la Cf es capaz de exacerbar la actividad de los linfocitos mediadores de CCDA, así como la capacidad fagocítica de los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares.

Mecanismos inmunológicos de defensa

La inmunidad innata es la capacidad constitutiva de los individuos para defenderse de una infección primaria. Los factores que determinan este tipo de inmunidad incluyen las barreras anatómicas y la secreción de sustancias microbicidas, cuyo nivel no se incrementa como resultado de una nueva experiencia con el parásito. En la respuesta de un animal a un agente dado es muy difícil distinguir entre mecanismos innatos y adquiridos por una exposición previa. Lo que sí resulta claro es que a medida que se avanza en la escala filogenética, los sistemas con los cuales los individuos se protegen de las infecciones van ganando en perfección y complejidad. Así por ejemplo, en los vertebrados superiores coexisten sistemas primitivos e inespecíficos de defensa, como la fagocitosis, con otros más evolucionados y específicos, como la producción de anticuerpos (Ac) y de células sensibilizadas.

Es posible agrupar los sistemas inmunológicos específicos de defensa de los mamíferos en tres grandes categorías:



En realidad, ante la llegada de un agente invasor, el sistema inmune pone en marcha varios de estos mecanismos simultáneamente; cada uno de los cuales está regulado a su vez por elementos humorales y celulares. Por ejemplo, la producción de Ac contra un antígeno (Ag) dado puede controlarse por la acción de células supresoras específicas e inespecíficas, y por la presencia de inmunoglobulinas dirigidas contra los Ac que se pretenden regular. Es decir, que aunque los fenómenos inmunológicos humorales y celulares probablemente no existan en forma aislada, la clasificación anterior permite un análisis más claro de los mismos.

Sistemas humorales de defensa:

En 1888, Roux y Yersin demostraron que en la sangre de los animales inmunes al bacilo de la difteria se encontraban sustancias capaces de neutralizar específicamente la toxina diftérica. Esta inmunidad antitoxina podía transferirse pasivamente a animales normales con suero inmune. Poco tiempo después, Von Boerhing denominó "anticuerpos" a aquellas sustancias encontradas en el suero de animales inmunes y capaces de conferir inmunidad pasiva. Pronto quedó en evidencia que los animales superiores poseen la capacidad para formar Ac específicos contra un número casi infinito de moléculas reconocidas como extrañas.

El rol que cumplen los Ac como elementos defensivos es múltiple. Son capaces de neutralizar toxinas, aglutinar bacterias e impedir la adsorción de virus a la membrana celular mediante su fijación a la superficie viral (11). Pero además, en condiciones fisiológicas los Ac actúan generalmente en forma conjunto con un sistema sérico multienzimá-

tico, conocido como sistema complemento (12). Cuando el Ac que reconoce y reacciona con el Ag es de tipo inmunoglobulina M (IgM) o G (IgG) puede inducir la activación de la proteína C1, primer componente del complemento, y desencadenarse así el fenómeno de activación en cascada del sistema. Este proceso puede conducir a la lisis del agente infeccioso o a la opsonización del mismo, facilitando de esta manera, la fagocitosis por las células del sistema retículo-endotelial (13). A su vez, la activación del complemento tiene otros efectos secundarios de importancia en la defensa del organismo, como son la inducción de fenómenos de quimiotaxis, la alteración de la permeabilidad vascular y la aceleración de los mecanismos de inmunoeeliminación de complejos inmunes circulantes.

Sistemas celulares de defensa:

a) Citotoxicidad directa:

La inmunidad humoral juega un papel menor en la resistencia hacia ciertas bacterias, virus, hongos y protozoos que tienen la capacidad de vivir y multiplicarse dentro de las células infectadas. En estos casos la defensa del organismo es llevada a cabo por linfocitos T sensibilizados hacia el Ag específico. Este mecanismo lítico se conoce como citotoxicidad directa y está implicado, además, en el rechazo de injertos y en la inmunidad tumoral (14,15).

El análisis "in vitro" de este proceso permitió conocer las condiciones necesarias para que se lleve a cabo. Los linfocitos T citotóxicos deben provenir de un individuo previamente sensibilizado contra el Ag expresado por la célula "blanco" de la lisis (1). Además de reconocer este Ag,

los linfocitos T deben reconocer Ag mayores de histocompatibilidad similares a los expresados por las células que originalmente estimularon la respuesta inmune (16). En las condiciones normales "in vivo", la célula infectada expresa los mismos Ag de histocompatibilidad que la célula citotóxica; por lo tanto, el reconocimiento de estos Ag sirve como un componente adicional de la especificidad de la reacción. Por el contrario, los Ac reaccionan contra los Ag extraños reconociéndolos independientemente de los productos de histocompatibilidad.

Otra característica de la citotoxicidad directa es la necesidad de un contacto íntimo entre las células efectoras y "blanco" (1). No se conoce aún el mecanismo preciso por el cual se induce el daño de la membrana celular, pero se descarta la liberación de sustancias tóxicas por parte del linfocito T efector. La destrucción final de la célula "blanco" se produce por la ruptura del equilibrio osmótico resultante de las lesiones en la membrana celular.

b) Citotoxicidad natural:

La citotoxicidad natural es un mecanismo por el cual linfocitos no sensibilizados son capaces de lisar ciertos tipos de células tumorales (17). Por ejemplo, los esplenocitos de ratas normales que nunca fueron expuestas al tumor, pueden destruir células singeneicas transformadas por el virus de la leucemia murina. Las células que median esta actividad, conocidas como NK (natural killer), fueron descritas en un principio como linfocitos que no expresan marcadores de células T ni B, pero sí presentan receptores para el fragmento Fc de la IgG (18). Sin embargo, usando técnicas más

sensibles fue posible asociar cierto porcentaje de células NK con el linaje de linfocitos T (19). Asimismo, hay evidencias que sugieren que determinadas células NK podrían ser promonocitos (20). Por esta razón, es más apropiado referirse a la actividad NK que a las células NK.

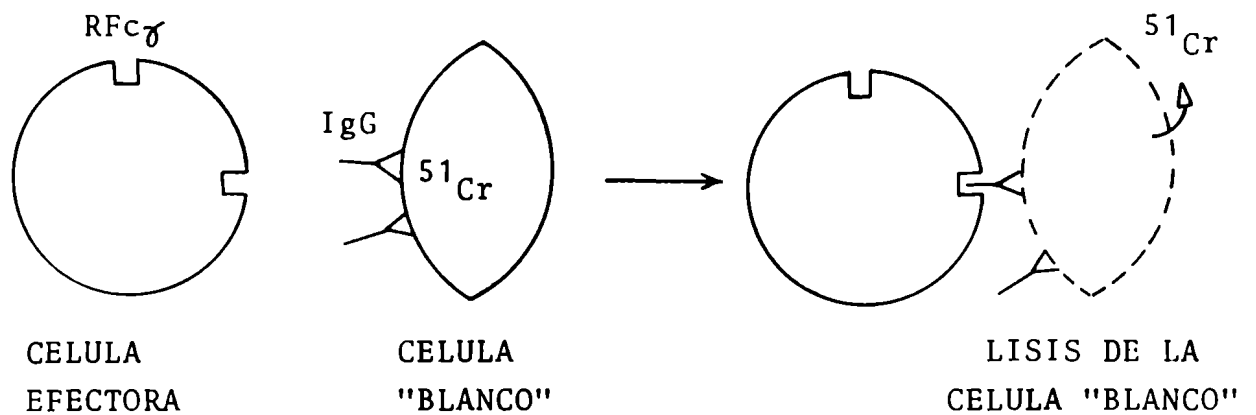
En el ratón, las diferentes cepas poseen niveles distintos de actividad citotóxica natural y el control de dichos niveles parece estar ligado al complejo mayor de histocompatibilidad. Así, la resistencia al tumor inducido por la inoculación "in vivo" de pequeñas cantidades de células transformadas por el virus de Moloney, está relacionada con el nivel individual y poblacional de citotoxicidad mediada por células NK (21). Resultados de este tipo sugieren que este mecanismo efector sería de gran relevancia en el control del crecimiento tumoral "in vivo", al menos para tumores inducidos por virus oncogénicos.

Sistemas combinados de defensa:

a) Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos:

En el año 1965, E. Moller describió un fenómeno citotóxico en el cual esplenocitos de ratones normales, no sensibilizados previamente con Ag, eran capaces de lisar células tumorales recubiertas con Ac específico (22). El ensayo se realizaba "in vitro", siendo la lisis independiente del agregado de complemento. Este fenómeno que se conoce con el nombre de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), ha sido demostrado contra un amplio espectro de células "blanco". La mayoría de los estudios se han realizado usando combinaciones heterogéneas de células efectoras, anti-

Figura 1: Representación esquemática de la reacción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)



La célula efectora reconoce los anticuerpos IgG que recubren a la célula "blanco" a través de los receptores para el fragmento Fc de IgG ($\text{RFc}\gamma$). Esta interacción conduce a la lisis de la célula "blanco" que libera al sobrenadante el ^{51}Cr con que ha sido marcada. La capacidad citotóxica de la célula efectora se calcula como el porcentaje de la radioactividad que se libera en relación al total ofrecido al sistema.

cuerpos y células "blanco". Por ejemplo, uno de los ensayos más comúnmente empleados consiste en cuantificar la lisis de glóbulos rojos de pollos recubiertos por inmunoglobulina de conejo utilizando linfocitos humanos como células citotóxicas. Es decir, que a diferencia de lo que ocurre en la citotoxicidad mediada por linfocitos T específicos, el mecanismo de CCDA se lleva a cabo sin restricciones a nivel de Ag de histocompatibilidad entre células efectoras y "blanco".

Las células que median la CCDA se caracterizan por expresar sobre su membrana receptores para el fragmento Fc de IgG (RFc γ) a través de los cuales reconocen los Ac unidos a la célula "blanco" (1,23). Las células linfoides han sido las más estudiadas en cuanto a su capacidad para mediar la CCDA, en particular los llamados linfocitos K (killer) que no expresan marcadores de células T o B (24). Sin embargo, existen otras células no linfoides como los monocitos, los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares (25), que pueden actuar como efectores de la reacción.

La mayor parte de los autores encuentran que los Ac que participan en la CCDA son del tipo IgG (1,23). Sin embargo, Lamon y col. (26) señalaron que la IgM también es capaz de ser reconocida por las células efectoras para inducir su activación, aunque no puede descartarse totalmente la contaminación de cantidades ínfimas de IgG en estas preparaciones. La IgE también fue descripta como Ac interviniente en la CCDA mediada por monocitos y polimorfonucleares eosinófilos (27).

Los RFc γ expresados por las células efectoras tienen muy baja avidéz para la IgG libre. Sin embargo, cuando la IgG forma parte de complejos inmunes, estos se unen a los RFc γ

celulares con gran avidéz, inhibiendo la CCDA totalmente. Evidencias recientes sugieren que el $\text{RFc}\gamma$ sería un multirreceptor formado por varios sitios de baja avidéz hacia otros tantos fragmentos Fc (28). El Ag que forma parte del complejo inmune actuaría concentrando moléculas de IgG que presentadas en forma conjunta al $\text{RFc}\gamma$ serían reconocidas con una avidéz mucho mayor que en forma aislada.

También es importante la afinidad de la IgG hacia el Ag expresado por la célula "blanco", ya que los Ac de alta afinidad son mucho más efectivos como mediadores en el sistema que los de baja afinidad (29).

El intenso estudio de que fue objeto el mecanismo de CCDA en la pasada década ha permitido establecer una serie de características particulares de este sistema. Es un requisito fundamental para que se produzca la lisis que las células efectoras estén vivas y metabólicamente activas (4,23). Debe producirse un contacto entre las células efectora y "blanco" a través del Ac. Este contacto puede prevenirse por el agregado de hapteno libre, pero una vez que ocurrió, el hapteno libre es inefectivo para impedir la lisis (30). Luego de este contacto se produce la activación de la célula efectora con la formación de urópodos y un incremento de la movilidad celular. De hecho, los inhibidores de la formación de microtúbulos, como las citochalasinás, impiden que la CCDA se produzca (31). Esta primera etapa también necesita de la presencia de iones Ca^{++} y Mg^{++} en el medio de cultivo (1). Strom y col. demostraron que el proceso lítico requiere energía, ya que no funciona en presencia de inhibidores de la respiración celular como la antimicina A y la oligomicina (31). El rol de la síntesis proteica en la CCDA es controvertido, aparentemente la actividad es independiente de la síntesis

de proteínas (32). A su vez, la mitomicina C, un inhibidor de la síntesis de DNA y la ouabaína, que afecta la ATPasa Na-K dependiente, no impiden que la CCDA se lleve a cabo (31, 33). Esta reacción citotóxica puede ser modulada alterando los niveles intracelulares de AMPc y GMPc. Se demostró que un incremento en el nivel de AMPc es acompañado de una reducción proporcional de la citotoxicidad, y lo contrario ocurre con el GMPc (34).

El mecanismo íntimo por el cual se produce la destrucción de la célula "blanco" no está totalmente aclarado. Se descarta, sin embargo, la liberación al medio de cultivo de sustancias tóxicas por parte de las células efectoras ya que nunca se encontraron en los sobrenadantes provenientes de la reacción. Por otra parte, si las células efectoras son puestas simultáneamente en presencia de dos tipos de células "blanco", unas sensibilizadas con Ac y otras no, solamente son lisadas las primeras (35). Estos resultados señalan la importancia del contacto celular a través de los Ac y son contrarios a la posible participación de factores solubles tóxicos en la reacción.

Otra de las características particulares de la CCDA es que desarrolla su actividad máxima a concentraciones muy bajas de Ac. En este sentido se ha demostrado que se necesitan de cien a mil veces menos IgG específica para lisar ciertas células "blanco" mediante el mecanismo de CCDA que para hacerlo por complemento (36,37).

El análisis de la cinética de la reacción sugiere que la lisis resulta de una sola colisión entre las células efectora y "blanco", y que ocurre casi inmediatamente luego del contacto (30). Si a este hecho se le suma el que se ne-

cesitan pequeñísimas cantidades de Ac para que se produzca la lisis y estos pueden ser reutilizados en un segundo ciclo lítico (38), queda claro que la CCDA es uno de los procesos citotóxicos más eficientes que se conocen.

El daño en la célula "blanco" se manifiesta primeramente por un aumento en la fragilidad osmótica y luego por una progresiva y creciente permeabilidad para los componentes intracelulares (23). Las células efectoras se inactivan también después de la interacción con la célula "blanco" (39).

La reacción de CCDA puede ser evaluada por diferentes métodos, siendo el de la liberación de ^{51}Cr el más utilizado. Esta técnica consiste en marcar las células "blanco" con ^{51}Cr antes de su exposición a las células citotóxicas, detectando el daño provocado por la medición del isótopo liberado al sobrenadante (4,23,36).

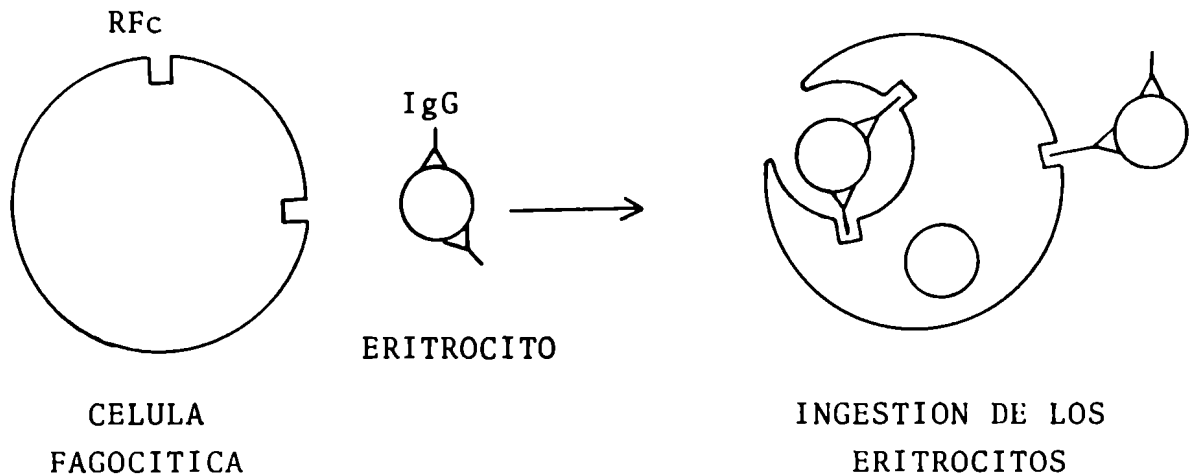
Desde su descripción en 1965, la CCDA ha sido investigada "in vitro" utilizando modelos experimentales. De esta forma, fue posible demostrar que funciona contra células tumorales (40), parásitos (27), células infectadas por virus (41) o bacterias (42), así como en el rechazo de injertos (43) y enfermedades autoinmunes (44). Debido a la notable eficiencia de esta reacción citotóxica para destruir "in vitro" células infectadas por virus con diluciones de Ac extremadamente altas, la CCDA podría actuar "in vivo" como un importante mecanismo inmune contra las infecciones virales. A pesar de que hasta el momento no hay evidencia directa de la actividad de la CCDA en condiciones fisiológicas, se han acumulado evidencias indirectas en este sentido. Fefer y col. fueron los primeros en demostrar una estrecha correlación entre el título de Ac funcionales en CCDA y el

crecimiento tumoral en ratones portadores de sarcomas inducidos por el virus de Moloney (45). Posteriormente, se describieron resultados similares utilizando otros virus oncogénicos, como el virus de Gross (46) y el virus de Epstein-Barr (47). Son interesantes los estudios realizados por Kohl y col. en relación a la importancia de la CCDA en la infección provocada por el virus Herpes (48). Los autores provocaban la muerte de ratones irradiados inoculando virus Herpes, resultando inefectiva como protección la transferencia pasiva de linfocitos normales o cantidades subneutralizantes de Ac específicos. Sin embargo, la administración simultánea de linfocitos normales y Ac permitía la supervivencia del 50% de los animales, lo que demostraba un efecto sinérgico entre ambos en la recuperación de los ratones. Cuando se transferían linfocitos de animales recién nacidos, que tienen muy poca actividad en la CCDA, junto con los Ac anti virus Herpes, la mortalidad volvía a ascender al 100%. Estos resultados indicarían que la CCDA juega un papel importante "in vivo" en el control del crecimiento de tumores inducidos por virus, así como de las infecciones virales.

b) Fagocitosis específica:

Las células fagocíticas del organismo, ya sean leucocitos polimorfonucleares (PMN) como mononucleares, constituyen una de las principales barreras contra las infecciones bacterianas gracias a su capacidad para ingerir y destruir material particulado. Los PMN se consideran, en general, la primera línea de defensa en la invasión de bacterias, ya que son los primeros en llegar al foco infeccioso atraídos por la liberación "in situ" de sustancias quimiotácticas (49). Si los PMN no pueden contener la infección, una segunda línea

Figura 2: Representación esquemática de la eritrofagocitosis específica



La célula fagocítica reconoce los anticuerpos específicos (IgG) que recubren al eritrocito a través de los receptores para el fragmento Fc de la IgG (RFc γ). Esta interacción conduce a la ingestión del eritrocito. La coloración de las células con May Grunwald-Giemsa permite determinar la actividad fagocítica por cuantificación del porcentaje de células con eritrocitos ingeridos, considerándose además el número de partículas fagocitadas por célula.

de defensa, los macrófagos, son puestos en acción originando una inflamación crónica. En el caso de ciertos agentes infecciosos, los PMN proveen el único mecanismo fagocítico efectivo, por lo que la existencia de defectos funcionales en estas células provoca generalmente infecciones fatales, como en el caso de la enfermedad granulomatosa de la niñez (50).

La acción de las células fagocíticas contra la mayor parte de los microorganismos es inespecífica. Sin embargo, durante la evolución, muchas bacterias patógenas han adquirido ciertas propiedades superficiales que las hacen no susceptibles a la fagocitosis (51). Para contrarrestar este sistema de protección, los animales superiores han desarrollado factores séricos, llamados "opsoninas" por Wright y Douglas (52), que se pegan a las bacterias y las hacen susceptibles de ser fagocitadas. Estas opsoninas son las inmunoglobulinas M y G y el componente C3 del complemento. Las inmunoglobulinas son anticuerpos específicos contra los Ag bacterianos y se unen a las células fagocíticas a través de RFc γ expresados por éstas. A su vez, la unión de la inmunoglobulina al Ag posibilita la activación de la vía clásica del complemento, generándose factor C3b que se adhiere firmemente a la célula agredida. Este factor es reconocido por los fagocitos mediante receptores específicos. Se ha demostrado que la interacción entre IgG que recubre al microorganismo y el RFc γ en la membrana de la célula fagocítica, induce la adherencia e ingestión de la partícula opsonizada; mientras que en ausencia de Ac, el componente C3b promueve la adherencia pero no la ingestión (53). Ciertos organismos son opsonizados perfectamente en suero carente de Ac o de los primeros componentes del complemento, lo que sugiere que la opsonización también puede ocurrir por activación de la vía alterna del complemento (54).

Una vez que la partícula opsonizada se ha adherido a la célula fagocítica se inicia el proceso de ingestión mediante la extensión de pseudópodos que rodean a la partícula y finalmente se fusionan formando la vesícula fagocítica o fagosoma primario. La ingestión de un microorganismo frecuentemente estimula a la célula para que ingiera otros. Se ha propuesto un modelo para explicar el proceso de ingestión conocido como "modelo del cierre relámpago" (55). En él se propone que los $\text{RFc}\gamma$ y receptores para C3b de la membrana del fagocito interaccionan en forma secuencial con los ligandos distribuidos sobre la superficie de la partícula, induciendo la agregación de proteínas contráctiles y la emisión de pseudópodos en esa área restringida. Este proceso se repite muchas veces hasta que las membranas de los pseudópodos se encuentran y fusionan para formar la vacuola fagocítica. De hecho, el uso de drogas que desorganizan la estructura del citoesqueleto (microtúbulos y microfilamentos) como la colchicina y la citochalasin B, inhibe totalmente el proceso fagocítico (53,56).

En el interior de la célula, el microorganismo queda expuesto a una variedad de sistemas microbicidas a los cuales muy pocos sobreviven. Estos mismos sistemas, bajo ciertas condiciones, son liberados al fluido extracelular donde pueden atacar parásitos demasiado grandes para ser ingeridos (57).

Normalmente, la destrucción de la mayoría de las bacterias depende de alteraciones en el mecanismo oxidativo de la célula, así como de la degranulación de los constituyentes lisosomales dentro de la vacuola fagocítica. Con respecto a la alteración en el mecanismo del O_2 , conocida como "estallido respiratorio" se ha demostrado que involucra cuatro

eventos fundamentales: 1- aumento de la incorporación de O_2
2- producción de iones superóxidos, 3- producción de agua oxigenada y 4- incremento en la oxidación de la glucosa (58). Este proceso metabólico provee a la célula de una batería de agentes oxidantes que son usados para la destrucción del microorganismo.

Por su parte, la degranulación de los lisosomas implica la fusión de estos con la vesícula fagocítica y la consiguiente acción tóxica de los componentes lisosomales sobre la partícula ingerida. Estos componentes incluyen: hidrolasas ácidas, lisozima, lactoperoxidasa, proteasas neutras y ciertas proteínas fuertemente básicas (57,59).

No todos los organismos fagocitados son destruidos en el interior de la célula. Algunos son capaces de lisar la membrana vacuolar y liberarse en la matriz citoplasmática, como los tripanosomas (60). Otros pueden inhibir la fusión de la vacuola fagocítica con los lisosomas y replicarse en el interior de la misma, por ejemplo, Mycobacteria, Leishmania y Listeria (61).

Los leucocitos PMN sucumben a las pocas horas después del evento fagocítico, en cambio los macrófagos pueden permanecer largo tiempo con los microorganismos ingeridos. En este último caso, la lesión, que se caracteriza por la acumulación de células epiteloides, se conoce con el nombre de granuloma (62).

Se han desarrollado diversas técnicas para cuantificar la fagocitosis. El método más simple consiste en incubar juntas las células fagocíticas y partículas apropiadamente opsonizadas, luego fijar y colorear los preparados para

contar directamente al microscopio óptico las partículas internalizadas (63). Otra técnica común consiste en marcar con isótopos radioactivos los organismos a ser fagocitados y luego de la ingestión medir la marca que quedó dentro de las células fagocíticas (64). También existen técnicas indirectas de cuantificación en las cuales se mide la liberación al medio de cultivo de enzimas lisosomales como consecuencia del proceso fagocítico (65).

Ciclofosfamida

La ciclofosfamida (Cf) es un derivado de la mostaza nitrogenada sintetizada por Arnold y col. en 1958 (7,66). La intención de estas investigaciones, iniciadas por Seligman años antes, era tratar de preparar agentes alquilantes latentes que se degradaran en productos tóxicos preferentemente en las células tumorales. La Cf mostraba, en efecto, una mayor toxicidad hacia las células transformadas que fue atribuida en un principio a una activación enzimática selectiva dentro de éstas (67). Sin embargo, pronto quedó en evidencia que el clivaje de la Cf en productos tóxicos se realizaba en el hígado, y que la mayor sensibilidad de las células tumorales a la droga se debía a la carencia de ciertas enzimas involucradas en la detoxificación celular (68). La Cf se ha utilizado desde entonces en la quimioterapia del cancer (69).

En 1963, Berenbaum y Brown publican la primera observación de la acción de la Cf sobre el sistema inmune; consiguen prolongar la sobrevida de injertos en ratones por tratamiento con una única dosis de Cf (70). A partir de la demostración de que la droga actúa como un potente inmunosupresor se ha utilizado extensamente para el pretratamiento de individuos receptores de transplantes de médula ósea, como alternativa a la irradiación (71). Además, ha sido aplicada a pacientes con desórdenes inmunológicos, en particular a individuos con artritis reumatoidea (72), vasculitis (73) y lupus eritematoso sistémico (74).

En general, se considera que los agentes alquilantes actúan combinándose con ciertas moléculas intracelulares,

especialmente ácidos nucleicos y proteínas. Estos componentes vitales son desnaturalizados "in situ" por formación de puentes intermoleculares (75). Las poblaciones celulares que están proliferando en forma activa son considerablemente más sensibles a los agentes alquilantes que aquellas que no sufren división (6). Esto está bien ejemplificado por los efectos colaterales que provoca la administración prolongada de Cf en tejidos tales como médula ósea, folículos pilosos, ovarios, testículos y células linfoides (76).

Metabolismo:

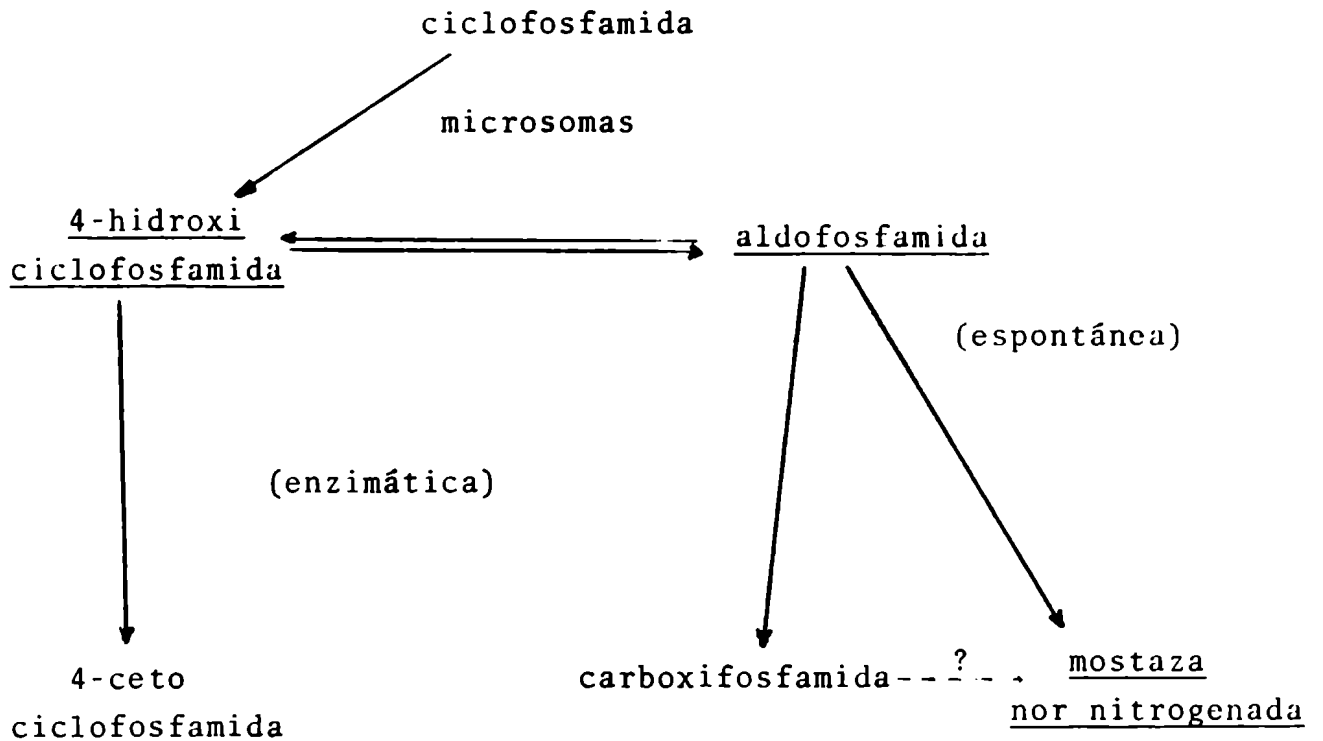
La Cf nativa es absolutamente no tóxica, tanto para células tumorales como para linfocitos, cuando se incuban junto con la droga "in vitro" (77). Sin embargo, "in vivo" es clivada por las enzimas microsomales del hígado dando lugar a un serie de metabolitos con actividad alquilante y citotóxica (figura 3) (78).

La vida media de la Cf nativa varía notablemente entre especies, siendo en el plasma humano de menos de 6,5 horas (69). Lo mismo ocurre con los metabolitos activos, que en el caso de la rata alcanzan un pico en la sangre 30 minutos después de la inyección de Cf y desaparecen del suero a las 4 horas (79).

Acción de la Cf sobre el tejido linfoide:

El sistema inmune está constituido fundamentalmente por dos tipos celulares: los linfocitos B, que van a dife-

Figura 3: Camino metabólico de la ciclofosfamida



Los metabolitos con comprobada acción antitumoral e inmunosupresora han sido **subrayados**.

Extractado de Shand,FL; Intern. J. Immunopharmacol. 1,165 (1979)

renciarse en células secretoras de Ac una vez reconocido el Ag, y los linfocitos T, que complen funciones efectoras en la inmunidad mediada por células y reguladoras de todas las respuestas inmunológicas. Las interacciones entre las distintas poblaciones linfocitarias posibilitan una respuesta equilibrada y específica ante el estímulo antigénico.

Desde los primeros estudios sobre el efecto de la Cf como inmunosupresor, se trató de establecer si la acción de la droga se ejerce de forma similar en todas estas poblaciones de linfocitos o, si por el contrario, existen algunas más sensibles que otras. Histológicamente, se observa que una única dosis subletal de Cf produce una severa depleción de linfocitos en las áreas ricas en células B tanto del bazo como en los ganglios linfáticos; mientras que las áreas T dependientes permanecen esencialmente intactas (80). Sin embargo, en sangre periférica el mismo tratamiento provoca una linfólisis inicial no selectiva (81). Estas diferencias podrían deberse a una sensibilidad distinta a la Cf de las poblaciones de linfocitos T que, como se sabe, no se hallan uniformemente distribuídas en los diferentes compartimentos del sistema inmune (82). Esto es, que las poblaciones T más sensibles a la droga se encuentren preferentemente en bazo y ganglios linfáticos. Además, los linfocitos B muestran una recuperación más lenta que los T después de la administración de una única dosis de Cf (80,83).

Los criterios morfológicos para determinar la relativa susceptibilidad de las células B y T a la Cf proveen una información muy limitada. A partir de la demostración de su potencial inmunosupresor se ha estudiado intensivamente los efectos de la administración de Cf en las respuestas inmunes humorales y celulares.

A continuación se describen las observaciones realizadas hasta el momento.

Acción de la Cf sobre las respuestas inmunes

* Respuesta humoral:

Los primeros estudios realizados por Stender y col. (84) demostraron que la Cf era una potente droga inmunosupresora de la producción de Ac contra Ag timo dependientes. Posteriormente, también se puso de manifiesto la actividad inhibidora de la Cf hacia Ag timo independientes (85,86). En ambos casos la supresión obtenida era claramente dependiente de la dosis de Cf utilizada.

Trabajos realizados por distintos investigadores demostraron que la capacidad de la Cf para suprimir la respuesta humoral depende de varios factores además de la dosis utilizada. Por ejemplo, el tiempo en que se inyecta la droga en relación a la inmunización es muy importante. Se observa una máxima supresión cuando la droga se inyecta en el período comprendido entre 3 días antes de la inmunización y el momento de ésta (87). La inoculación de Cf justo después del Ag puede inducir tolerancia, habiéndose descrito este efecto en varias especies y para Ag solubles y particulados (88, 89).

El pretratamiento con Cf no sólo es capaz de provocar supresión de la síntesis de Ac. Por el contrario, en ciertas ocasiones la inoculación de Cf pone en evidencia una capacidad potencial para producir Ac en un animal que normalmente no responde a ese Ag. Por ejemplo, los cobayos inmuni-

zados con DNP_{50} BGG no sintetizan Ac anti-BGG medidos por hemaglutinación indirecta (gamaglobulina del subtipo IgG_2) (90). Sin embargo, después del tratamiento con Cf es posible detectar estos Ac, lo que indicaría que la falla de los animales normales para producirlos no se debe a que los determinantes antigénicos de la molécula de BGG estén escondidos por los grupos DNP que la recubren, sino a la generación de células supresoras que bloquean el desarrollo de la respuesta (91). Estas células supresoras serían inhibidas por la Cf, permitiendo, de esta forma, la síntesis de Ac por parte de las células B. Estos experimentos ponen de manifiesto la existencia de ciertas líneas de linfocitos B productores de Ac hemaglutinantes que son resistentes a la acción de la Cf. Es decir, que dependiendo del Ag usado, el pretratamiento con Cf puede aumentar o disminuir el nivel de gamaglobulina del subtipo IgG_2 .

Cuando se miden Ac homocitotrópicos (IgG_1) por el ensayo de anafilaxia cutánea pasiva se obtienen resultados parecidos a los descritos para la IgG_2 (92). En general, no hay paralelismo entre las alteraciones de los niveles de inmunoglobulinas de los subtipos IgG_1 e IgG_2 inducidos por tratamiento con Cf. Se puede concluir que los linfocitos B precursores de los plasmocitos que sintetizan Ac homocitotrópicos y de los que segregan Ac hemaglutinantes pertenecen a poblaciones celulares diferentes en cuanto a su susceptibilidad a la Cf.

* Respuesta celular:

a) Hipersensibilidad retardada:

La Cf ha sido una herramienta valiosa para el estudio de las interrelaciones celulares que ocurren normalmente durante el desarrollo de una respuesta de hipersensibilidad retardada, ya que las poblaciones efectoras y reguladoras que intervienen en este tipo de respuesta varían en su susceptibilidad a la droga.

Al igual que ocurre con las respuestas de tipo humoral, la relación entre el momento de la sensibilización con el Ag y el tratamiento con Cf es determinante del tipo de alteración que se induce en las respuestas mediadas por células (10). Ya en 1961, Maguire y Maibach (93) demostraron que el tratamiento diario con dosis bajas de Cf durante el período de sensibilización, provoca una marcada supresión de la hipersensibilidad por contacto al 2,4-dinitrofluorobenceno. Sin embargo, si la droga se administra 2 a 3 días antes de la sensibilización se provoca un incremento en la reacción cutánea. Estos estudios fueron confirmados y ampliados por Turk y col., inoculando la Cf en una única dosis alta (8,34). Sus resultados demuestran que la inoculación de cobayos con 300 mg/kg de peso de Cf en el período comprendido entre 2 días antes y 2 días después de la sensibilización con 2,4-dinitrofluorobenceno provoca un incremento de las respuestas de hipersensibilidad por contacto de alrededor del 300%. En cambio, si la única dosis de Cf se administra entre los días 3 y 6 postsensibilización, la respuesta cutánea se ve suprimida casi totalmente. Este es el período después de la inmunización en que los linfocitos T del ganglio linfático drenante alcanzan su fase de máxima proliferación y son, por lo tanto, especialmente sensibles a la acción de la Cf (94). Por el contrario, cuando la Cf se administra antes del Ag, se observa un masivo incremento en la proliferación de las células T efectoras del ganglio 5 días después de la sensibilización,

indicando que estas células han sido liberadas de los controles inmunorregulatorios normales.

La capacidad de la Cf para incrementar las reacciones de hipersensibilidad retardada ha sido demostrada utilizando Ag solubles como la ovoalbúmina (92) o particulados como los glóbulos rojos de carnero (95), y Ag microbianos como tularemia vaccine (96). Sin embargo, el efecto potenciador de este tipo de reacciones no es igual para todos los Ag. Pareciera que cuanto más fuerte es la reacción inmune que induce un Ag, más fuerte es también la respuesta regulatoria que se desarrolla para controlar dicha reacción, y por ende, la acción de la Cf va a ser más evidente en estos casos. En este sentido, moléculas como la seroalbúmina bovina o la gamaglobulina bovina que se comportan como Ag relativamente débiles provocan respuestas de hipersensibilidad retardada que pueden ser muy poco aumentadas por pretratamiento con Cf (97).

Es de hacer notar, que se pueden conseguir marcados aumentos en el nivel de hipersensibilidad retardada con dosis muy bajas de Cf, que no son efectivas para suprimir las respuestas de producción de Ac (98). Esto hace pensar que las células T supresoras de la hipersensibilidad retardada son más sensibles que los linfocitos B al efecto de la droga.

b) Rechazo de injertos:

Berembaum y Brown (70) fueron capaces de conseguir la prolongación de la sobrevivencia de trasplantes de piel en ratones que diferían en Ag mayores de histocompatibilidad

tratándolos con una única dosis alta de Cf. El tratamiento resultaba eficiente si la droga se aplicaba en el período comprendido entre 4 días antes del injerto y 4 días después del mismo. Otro tanto ocurre para el caso de transplantes de tumores alogeneicos donde el efecto supresor de la respuesta de rechazo inducida por la Cf sólo se consigue inoculando los ratones muy pocos días antes del transplante (99).

Como es sabido, las células efectoras en el rechazo de injertos son linfocitos T que reconocen los aloantígenos expresados por las células del injerto y se vuelven citotóxicas contra ellas. Cuando se estudió la capacidad de los linfocitos provenientes de animales tratados con Cf para desarrollar citotoxicidad "in vitro" contra células alogeneicas, se encontró que ésta estaba marcadamente inhibida (100). Además, a diferencia de lo que ocurría con el rechazo de injertos, la recuperación completa de la actividad citotóxica era muy lenta y no podía generarse hasta después de 45 días post-tratamiento con Cf (99).

c) Reacción de injerto contra huésped:

La enfermedad de injerto contra huésped comprende una serie de eventos inmunológicos cuya total comprensión está lejos de ser alcanzada. Tradicionalmente, se consideró que esta reacción se producía como consecuencia del reconocimiento, por parte de los linfocitos T inmunocompetentes del injerto, de los Ag de histocompatibilidad extraños del huésped (82, 101). Sin embargo, un mecanismo de este tipo no es válido para explicar por qué se produce la enfermedad de injerto contra huésped en transplantes de médula ósea entre

gemelos idénticos (102).

A partir de su descubrimiento, la Cf ha sido empleada extensamente en las investigaciones relacionadas con la reacción de injerto contra huésped. Clínicamente, este síndrome es uno de los mayores obstáculos para la transferencia exitosa de células de médula ósea. Desde un principio, y gracias a su potente actividad inmunosupresora, la Cf se ha empleado con éxito para disminuir la incidencia y la severidad de la enfermedad de injerto contra huésped (103,104).

Por otra parte, recientemente se ha utilizado la capacidad de la Cf para alterar el balance inmunorregulatorio normal con el fin de entender mejor los eventos que ocurren durante la reacción de injerto contra huésped. A partir de la observación de este síndrome como consecuencia del trasplante entre individuos genéticamente idénticos, se obtuvieron una serie de evidencias que señalan las similitudes entre las reacciones de injerto contra huésped y la autocitotoxicidad (105,106). La Cf ha jugado un rol muy importante en estas investigaciones y su empleo ha permitido demostrar que los mecanismos que regulan las poblaciones autorreactivas y las involucradas en la reacción de injerto contra huésped son similares.

* Tolerancia inmunológica:

El fenómeno por el cual es posible provocar un estado persistente de tolerancia inmunológica inoculando el Ag durante la fase de inmunosupresión inducida por drogas, fue descrito originalmente con 6-mercaptopurina (107). Cuando

se realizaron estudios similares utilizando Cf, se vio que los mecanismos involucrados en esta incapacidad para responder al Ag son diferentes si se trata de Ag timo dependientes o independiente. En el caso de los primeros, son los linfocitos T los que se ven afectados por la droga, ya sea por eliminación de la población T colaboradora específica para el Ag o por la inducción de linfocitos T supresores (108). En cambio, la tolerancia inmunológica hacia Ag timo independientes estaría relacionada con la incapacidad de las células B para expresar receptores antigénicos (inmunoglobulinas) sobre su membrana después del "capping" (85,109).

La demostración de que la Cf puede incrementar, en lugar de suprimir, algunas respuestas inmunes como la hipersensibilidad retardada, llevó al estudio de su efecto en ciertos modelos de tolerancia inmunológica con la intención de revertir dicho estado. De esta forma, Polak y Turk (110) encontraron que el tratamiento de cobayos con altas dosis de Cf posibilita la reversión de la tolerancia hacia el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno inducida por inyección endovenosa de dinitrobencenosulfonato. En este modelo de tolerancia, las células T de los ganglios linfáticos que drenan la zona de sensibilización son incapaces de proliferar probablemente por la existencia de linfocitos supresores. El pretratamiento con Cf permite la proliferación de las células efectoras postulándose que la droga eliminaría a las células inhibitoras.

MATERIALES Y METODOS

a) Medio de cultivo:

En todas los experimentos se utilizó medio de cultivo 199 (GIBCO, Grand Island, USA) suplementado con 2,5% de suero fetal bovino inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos, penicilina 100U/ml y estreptomycin 100 ug/ml.

b) Solución de Turk para contaje de leucocitos:

Esta solución está constituida por: 100 mg de violeta de genciana, 31,25 ml de ácido acético glacial y agua destilada c.s.p. 500 ml. Las suspensiones celulares a contar se diluyeron 1:10 con esta solución, que lisa los eritrocitos y tiñe los núcleos de azul-violeta. Las células se contaron en cámaras cuentaglóbulos (Cámaras de Neubauer).

c) Prueba de viabilidad celular:

Para determinar la viabilidad celular se utilizó la siguiente solución: azul tripan: 0,14 g%, cloruro de sodio: 4,25%, que se mezclaron en una proporción 4 a 1 justo antes de usar. Las muestras en estudio se diluyeron 1:10 con esta solución y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Las células viables excluyen el colorante, mientras que las no viables se ven azuladas al microscopio óptico.

d) Solución de Ficoll-Hypaque:

Las células mononucleares circulantes periféricas se separaron de las polimorfonucleares centrifugando sangre periférica diluída al tercio sobre una solución de Ficoll-Hypaque según el método de Bøyum (111).

La solución de Ficoll-Hypaque se preparó agregando a 2,4 volúmenes de Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) al 9% en agua destilada, un volumen de Hypaque (Winthrop Products Inc., Farmasa Farmacéutica Argentina, Buenos Aires) al 34% en agua destilada. La densidad final de la solución a 20°C fue de 1,073 g/l.

e) Lisis de eritrocitos:

La eliminación de eritrocitos contaminantes se llevó a cabo lisándolos con una solución tampón de Tris-(hidroximetil)-aminometan(2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol): 0,02M y ClNH_4 : 0,75 g%, pH= 7,2. Las suspensiones celulares se incubaron 10 minutos a 37°C con esta solución y se lavaron al menos tres veces antes de utilizar.

f) Animales:

En todos los experimentos de CCDA y fagocitosis se utilizaron ratones machos, adultos de la cepa BALB/c. Para la preparación de antisueros se usaron conejos adultos. Los animales fueron provistos por el bioterio de la Sección Leucemia Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina.

g) Tratamiento de los animales:

g-1) Con ciclofosfamida:

La ciclofosfamida (Endoxan-Asta, Labinca Laboratories, Buenos Aires) se disolvió en solución salina (ClNa 0,85 g%) estéril y se conservó en congeladora de -20°C durante no más de 2 meses. La droga se inoculó por vía intraperitoneal en una única dosis de 200 mg por kilogramo de peso corporal (volumen de 0,1 a 0,2 ml) para la mayor parte de los experimentos.

g-2) Con tioglicolato:

El medio de tioglicolato (Bacto fluid thioglycollate medium, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) fue disuelto en agua destilada, estéril y conservado en heladera. Antes de ser usado se hirvió de 3 a 5 minutos para su completa disolución y se inoculó, por vía intraperitoneal en una única dosis de 0,5 ml (0,5 g de tioglicolato de sodio/litro).

h) Obtención de las células efectoras en CCDA:

h-1) Suspensiones de bazo, ganglios y timo:

Los animales fueron sacrificados al séptimo día post-inoculación de la Cf y se les extrajo el bazo que se desmenuzó cuidadosamente con tijeras y se hizo pasar a través de una malla fina de acero inoxidable. La suspensión de esplenocitos se lavó tres veces con medio de cultivo y se resuspendió para determinar la viabilidad celular por exclusión del colorante azul tripan , así como el número de células obteni-

do. En todos los experimentos, más del 80% de las células del bazo fueron viables, siendo el 95-98% células mononucleares y el 2-5% leucocitos polimorfonucleares (PMN).

Para la preparación de las células de nódulo linfático se extrajeron los ganglios axilares, inguinales y mesentérico, y se procedió de la misma manera que con el bazo. Otro tanto se hizo para obtener la suspensión de timocitos. La viabilidad de las células de ganglios y de timo fue mayor al 90% y no se observó contaminación con PMN.

h-2) Separación de leucocitos mononucleares y polimorfonucleares de sangre periférica:

Para la obtención de células mononucleares y PMN de sangre periférica los animales se sangraron por punción del seno retroorbital. La sangre fue desfibrinada por agitación con perlitas de vidrio y diluída al tercio con medio de cultivo 199. La separación de los dos tipos celulares se realizó cnetrifugando la sangre diluída sobre una solución de Ficoll-Hypaque según el método de Bøyum (111).

Luego de 30 minutos de centrifugación a 400 x g en frío, las células mononucleares permanecieron en la interfase sangre/Ficoll-Hypaque, mientras que los leucocitos PMN y los eritrocitos se recogieron en el fondo del tubo. Estos últimos fueron lisados incubando la suspensión con un mismo volumen de solución tampón de Tris-ClNH₄. Las células se lavaron tres veces y se determinó su viabilidad y su número.

La contaminación con células mononucleares fue alta (de 30 a 40%) en el caso de la sangre proveniente de ratones normales y más baja (de 10 a 15%) cuando provenía

de animales tratados con Cf. Como no fue posible mejorar la separación alterando la densidad de la solución de Ficoll-Hypaque, los tiempos de centrifugación y/o la temperatura, se agregó a la suspensión de leucocitos PMN tratados una cantidad de células mononucleares tal que se igualaron los niveles de contaminación.

Las células mononucleares que se recogieron de la interfase sangre/Ficoll-Hypaque, se lavaron tres veces con medio de cultivo, se contaron usando solución de Turk y su viabilidad se determinó por exclusión de azul tripan, siendo siempre mayor al 90%. La contaminación con células PMN fue menor al 8%.

i) Marcación de eritrocitos con cromato de sodio radioactivo:

Se obtuvo sangre de pollo por punción de la vena del ala con una jeringa humedecida con heparina (Abbot Laboratories, Argentina). La sangre se diluyó 1:10 con medio de cultivo, marcándose 0,1 ml de esta suspensión con 50-100 μCi de ^{51}Cr (CNEA, Buenos Aires o New England Nuclear, Boston Massachusetts, USA). Luego de una incubación de 1 hora a 37°C con agitación intermitente, se lavaron las células cuatro veces con medio de cultivo y se suspendieron a la concentración deseada.

Los glóbulos rojos de carnero se obtuvieron a partir de sangre estabilizada ovina (A. Gutierrez, Buenos Aires) que se lavó tres veces con solución fisiológica y se marcó con ^{51}Cr en iguales condiciones a las descritas para eritrocitos de pollo.

j) Preparación del suero anti-eritrocitos de pollo:

Para la obtención de suero de conejo anti-eritrocitos de pollo, se inocularon conejos por vía endovenosa con 1 ml de suspensión de eritrocitos de pollo al 10% en solución salina. Los animales recibieron dos inyecciones semanales durante un mes. Cuarenta y cinco días después de la primera inoculación, se sangraron los conejos y se separó el suero que fue conservado a -20°C hasta su uso.

k) Reacción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA):

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) fue medida según el método de Perlmann y col., ligeramente modificado (112). Las suspensiones celulares a ensayar se prepararon en medio de cultivo y se mezclaron alícuotas de 0,1 ml conteniendo cantidades variables de células (rango entre $0,1$ y $1,5 \times 10^6$) con $0,1 \times 10^6$ eritrocitos de pollo marcados con ^{51}Cr y cantidades subaglutinantes de suero de conejo anti-eritrocitos de pollo. El volumen final de la reacción fue de 0,2 ml y se llevó a cabo en tubos de Kahn de vidrio. Los controles para determinar liberación espontánea de ^{51}Cr o citotoxicidad inespecífica se realizaron en ausencia de Ac anti-eritrocitos de pollo.

Las reacciones se incubaron 18 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire. Al final de este período, las células fueron resuspendidas, centrifugadas 10 minutos a $400 \times g$ y la mitad del volumen de cada sobrenadante fue transferida a otro tubo. La radioactividad de las muestras (sedimentos y sobrenadantes) se determinó en un contador gama (Packard 3320

automático).

La capacidad de las células para mediar CCDA se visualiza por la ruptura de las células "blanco" (eritrocitos de pollo) y la consiguiente liberación al sobrenadante del ^{51}Cr con que estaban marcados. Para cuantificar el efecto citotóxico se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = \frac{\text{CPM sobrenadante} \times 2}{\text{CPM totales}} \times 100$$

Este valor fue corregido por la sustracción de la actividad citotóxica inespecífica en ausencia de Ac y de la liberación espontánea de ^{51}Cr de los eritrocitos marcados. En la mayoría de los experimentos esta actividad no específica fue menor al 5%.

1) Formación de roseta EA:

Para determinar el porcentaje de células de bazo que expresan receptores para el fragmento Fc de IgG (R $\text{Fc}\gamma$) se cuantificó el número de rosetas que se forman entre estas células y eritrocitos de pollo sensibilizados con IgG específica (rosetas EA) (113).

La sangre de pollo se obtuvo por punción de la vena del ala con una jeringa humedecida con heparina. Los eritrocitos fueron lavados tres veces con medio de cultivo y sensibilizados con la máxima cantidad no aglutinante de suero de conejo anti-eritrocito de pollo por incubación durante 30 minutos a 37°C. Luego de este período, los eritrocitos se lavaron dos veces y se resuspendieron al 0,5% en medio de culti-

vo. Para la formación de las rosetas, se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión de eritrocitos de pollo sensibilizados y de la suspensión de células de bazo, en una relación de 5 a 10 glóbulos rojos por esplenocito. Las mezclas se centrifugaron a 200 x g, 5 minutos y se incubaron a 37°C de 30 a 60 minutos. Finalmente, las células se resuspendieron suavemente y se contó el porcentaje de células de bazo con 3 o más eritrocitos unidos (rosetas EA) sobre un total de 200 células. Paralelamente y en idénticas condiciones se hicieron los controles con eritrocitos de pollo sin sensibilizar.

11) Respuesta de producción de anticuerpos:

Con el objeto de estudiar la capacidad para producir anticuerpos de los animales tratados con Cf en una única dosis alta, se inmunizaron por vía intraperitoneal con 10^8 glóbulos rojos de carnero suspendidos en 0,1 ml de solución salina estéril. Dos días después, los animales recibieron 200 mg/kg de peso de Cf o 0,1 ml de solución salina (grupo control). A los cinco días, se desafiaron con 10^8 glóbulos rojos de carnero suspendidos en 0,05 ml de solución salina inoculados en la almohadilla plantar izquierda. Los ratones se sangraron individualmente por punción en el seno retroorbital 24 horas más tarde, se obtuvieron los sueros que se inactivaron por calentamiento a 56 °C durante 30 minutos y se conservaron a -20°C hasta su uso.

Para la detección de Ac anti-glóbulos rojos de carnero en los sueros se utilizó la técnica de hemaglutinación directa en microplacas (114). Se incubaron alícuotas de 0,03 ml de diluciones crecientes de cada suero con 0,03 ml de glóbulos rojos de carnero suspendidos al 1% en solución salina.

Las microplacas se incubaron una hora a 37°C y, al menos 2 horas, a 4°C. Finalmente, se leyeron los resultados de la aglutinación de los eritrocitos.

m) Respuesta de hipersensibilidad retardada:

Los mismos animales utilizados para la medición de la respuesta humoral, se estudiaron en cuanto a su capacidad para originar una respuesta de hipersensibilidad retardada. Al día siguiente del desafío con glóbulos rojos de carnero inoculados en la almohadilla plantar, se midió el grosor de la misma usando para ello un calibre adecuado (Pocotest, Ges. Gesch.). Este valor se comparó con el tamaño de la almohadilla plantar previo a la inoculación de eritrocitos, siendo el aumento del grosor un índice de la positividad de la respuesta de hipersensibilidad retardada (115).

Se realizaron tres tipos de controles: un grupo de 6 animales se inoculó con 0,1 ml de solución salina en lugar de ser inmunizado con glóbulos rojos de carnero y recibió 10^8 eritrocitos en la almohadilla plantar 24 horas antes del ensayo de hipersensibilidad retardada. Otro grupo de 6 ratones fue inmunizado dos días después del tratamiento con Cf, pero no recibió el desafío con glóbulos rojos de carnero en la almohadilla plantar. Además, los animales experimentales fueron inoculados con 0,05 ml de solución salina en la almohadilla plantar derecha el día del desafío para verificar si la inyección de por sí provocaba una hinchazón de la pata. En ninguno de los tres tipos de controles realizados se produjo un aumento del tamaño de la almohadilla plantar que pudiera superponerse con la verdadera respuesta de hipersensibilidad retardada.

n) Obtención de las células del exudado peritoneal:

Los leucocitos del exudado peritoneal se obtuvieron por el método de Cohn y Benson (116). Los animales, inoculados con Cf o solución salina, se sacrificaron 7 días después del tratamiento. Cada animal fue pinchado a una placa de telgopor manteniéndole las extremidades bien extendidas. Se le realizó una incisión en la piel y se expuso el peritoneo que se levantó con una pinza para poder inyectarle de 2 a 4 ml de medio de cultivo. La cavidad peritoneal se masajeó suavemente y luego se le introdujo una pipeta Pasteur con la que se aspiró el líquido inyectado junto con las células del exudado. Estas células fueron contadas con solución de Turk y se les determinó la viabilidad por exclusión de azul tripan.

ñ) Preparación del suero anti-eritrocitos de carnero:

El suero anti-glóbulos rojos de carnero se obtuvo por inoculación intraperitoneal de 12 ratones BALB/c, machos, adultos con 0,1 ml de eritrocitos ovinos suspendidos al 1%. Los ratones recibieron una inyección por semana durante un mes y fueron sangrados a blanco 45 días después de la primera inoculación. Los sueros obtenidos se juntaron para su inactivación y se conservaron congelados a -20°C hasta el momento de usarse.

o) Preparación de complejos eritrocitos de carnero-anticuerpo:

Los complejos inmunes se prepararon mezclando volúmenes iguales de una suspensión al 10% de eritrocitos ovinos y cantidades subaglutinantes de suero de ratón anti-eritroci-

tos ovinos. La mezcla se incubó 30 minutos a 37°C con agitación frecuente. Luego, los complejos se lavaron una vez y se resuspendieron en medio de cultivo al 5%.

p) Reacción de fagocitosis específica:

p-1) In vitro:

Se hicieron adherir alícuotas de 1 ml de suspensión del exudado peritoneal (1 a 2×10^6 células/ml) a portaobjetos de vidrio (76 x 26 mm) por incubación de 15 minutos a 37°C en una atmósfera humidificada, que contenía 5% de CO₂ en aire. Los portaobjetos fueron lavados tres veces con 5 ml de solución salina fría con el objeto de remover las células no adherentes. Luego los portaobjetos se cubrieron con 1 ml de la suspensión de complejos eritrocitos ovinos-anticuerpos y se incubaron 30 minutos a 37°C en estufa gaseada. Finalmente, los portaobjetos se lavaron con 5 ml de solución salina fría y se tiñeron con May Grunwald-Giemsa para su examinación visual.

Para cada determinación se contaron al menos 100 macrófagos y polimorfonucleares, considerándose el porcentaje de células con uno o más eritrocitos ingeridos sobre el total de células contadas. En algunos casos, se determinó también el número de eritrocitos ingeridos por célula. Para cada experimento, se realizaron controles utilizando eritrocitos no sensibilizados. En ningún caso se observó ingestión de dichos eritrocitos.

p-2) In vivo:

Los animales se inocularon con 0,5 a 1 ml de la suspensión de complejos eritrocitos ovinos-anticuerpos por vía intraperitoneal. A los 45 minutos fueron sacrificados y se extrajeron las células del exudado peritoneal según la técnica de Cohn y Benson descrita en el punto n). Se lisaron los glóbulos rojos de carnero de la suspensión del exudado con ClNH_4 (10 minutos a 37°C). Las células se lavaron dos veces y se hicieron adherir a portaobjetos, incubándolas 15 minutos en estufa a 37°C . Los pasos siguientes son los mismos que para la medición "in vitro" de la fagocitosis.

RESULTADOS:

I- Acción de la Cf sobre la citototoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA):

Se inocularon ratones machos de la cepa BALB/c con una única dosis intraperitoneal de 200 mg/kg de peso de Cf. Esta dosis fue elegida porque es la utilizada corrientemente en ratones para inducir alteraciones de las respuestas inmunológicas como la producción de anticuerpos y la hipersensibilidad retardada (7,78,90). Los animales se sacrificaron el séptimo día post-inoculación y se estudió la actividad de sus células de bazo para mediar la CCDA contra glóbulos rojos de pollo (Ep), como se indica en Materiales y Métodos. En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos. Se observa que las células efectoras provenientes de animales que recibieron Cf tienen una capacidad notablemente mayor para lisar Ep que los esplenocitos normales. Es de hacer notar que con sólo $0,1 \times 10^6$ de células tratadas se consiguen efectos líticos similares a los que se obtienen usando $1,5 \times 10^6$ células normales.

A lo largo de todo el trabajo experimental realizado para esta tesis, se compararon más de 100 ratones en su capacidad citotóxica, en todos los casos los ratones tratados mostraron una actividad lítica significativamente mayor que los controles. Sin embargo, existe una gran variabilidad individual entre los porcentajes de CCDA obtenidos con los esplenocitos de los diferentes ratones normales, y también en los incrementos de la actividad citotóxica inducidos por la droga. Así, en algunos experimentos el tratamiento con Cf produjo aumentos del 50% en la liberación de ^{51}Cr comparando con los controles correspondientes, mientras que en otros casos los

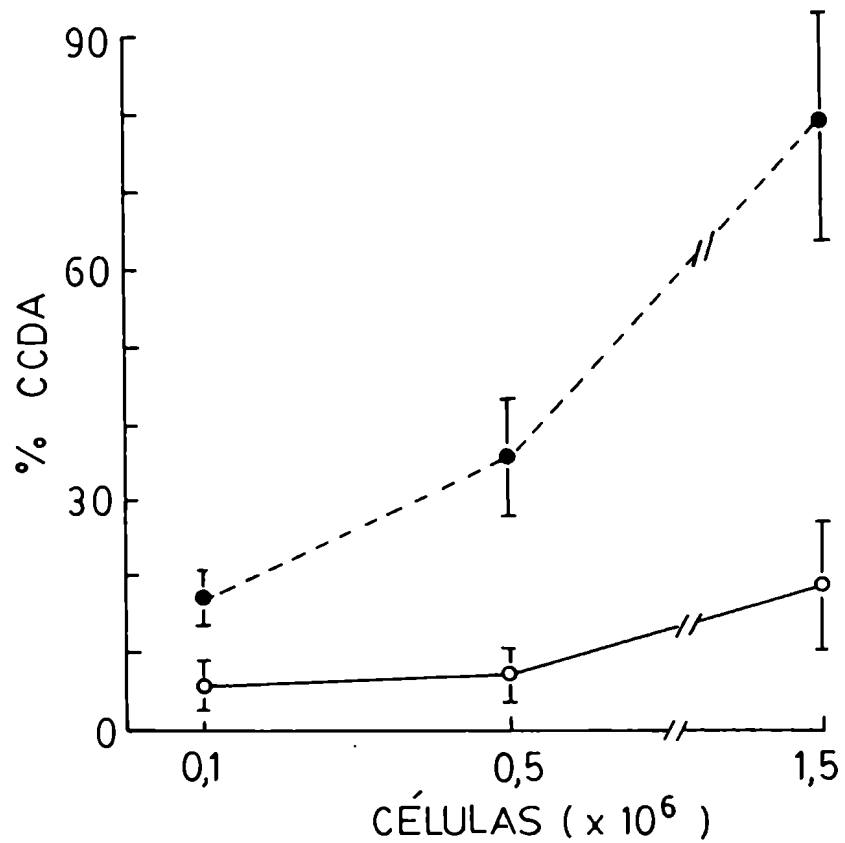
incrementos fueron del 500% o más.

Una vez establecido el efecto de exacerbación de la CCDA que provoca el tratamiento con Cf, se trató de analizar el sistema con más detalle. Para ello, se realizaron los experimentos que se describen a continuación.

1) Dependencia de la dosis:

Con el fin de determinar si el efecto de la Cf sobre la CCDA era dependiente de la dosis, se inocularon ratones machos de la misma edad con 4 dosis diferentes de Cf: 20, 50, 100 y 200 mg/kg de peso. A los 7 días, los animales se sacrificaron y sus esplenocitos se probaron en su capacidad para mediar CCDA. Los resultados mostrados en la figura 5 indican que no hay diferencias en los porcentajes líticos obtenidos con células provenientes de animales controles y tratados con 20 mg/kg de Cf. Los ratones que recibieron 50 mg/kg muestran un aumento en su capacidad citotóxica que se acentúa a medida que se incrementa la dosis.

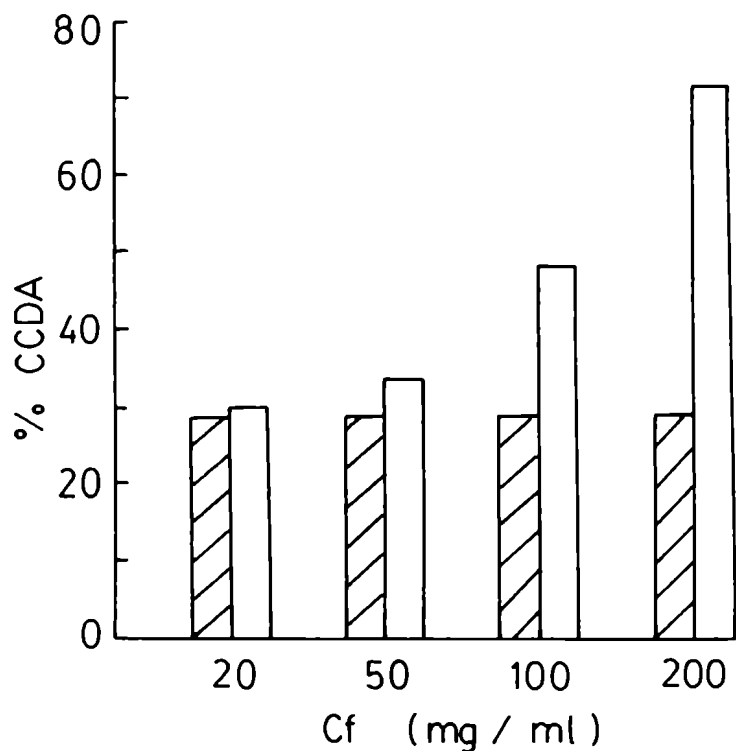
Figura 4: Efecto de la ciclofosfamida sobre la CCDA:



Se incubaron esplenocitos normales (○—○) o provenientes de animales tratados con Cf (200 mg/kg de peso) siete días antes (●—●) con $0,1 \times 10^6$ eritrocitos de pollo marcados con ^{51}Cr y sensibilizados con anticuerpos específicos. La reacción de CCDA se realizó por incubación de las mezclas durante 18 horas a 37°C .

Cada punto representa la media \pm ES de 4 animales. Se realizaron 6 experimentos posteriores obteniéndose resultados similares.

Figura 5: Relación entre la dosis de ciclofosfamida y la actividad de CCDA:



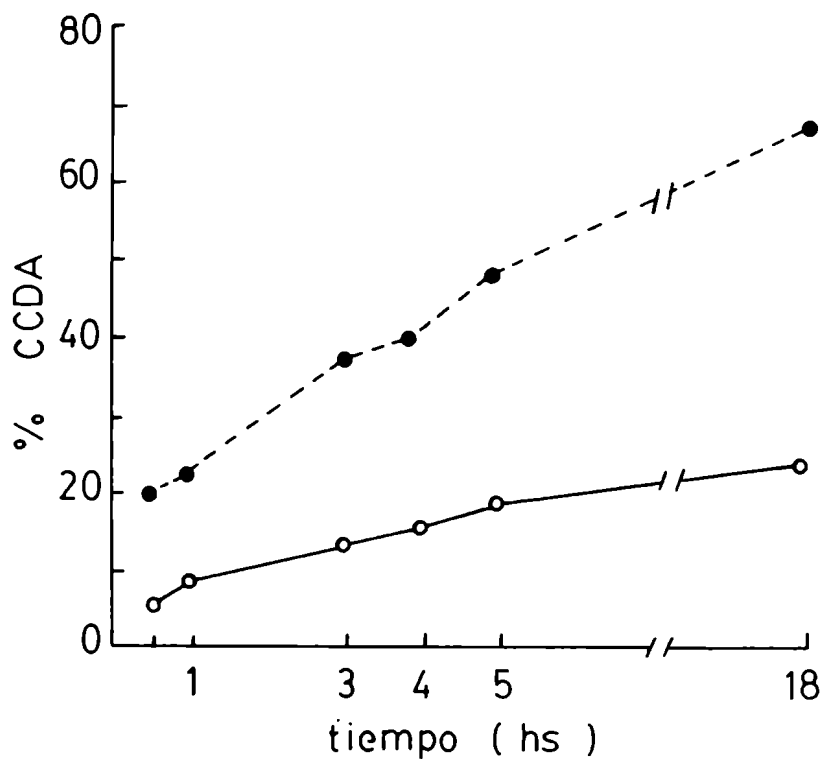
Ratones BALB/c se inocularon i.p. con las distintas dosis indicadas en la figura (barras lisas) o solución fisiológica (barras ralladas). Siete días más tarde se determinó la capacidad para mediar CCDA de los esplenocitos, incubando $0,5 \times 10^6$ células de bazo junto con $0,1 \times 10^6$ eritrocitos de pollo marcados con ^{51}Cr y sensibilizados con anticuerpos específicos durante 18 horas a 37°C . Cada valor representa la media de 4 animales.

2) Cinética de la reacción:

Como se describió en Materiales y Métodos, en estos trabajos la reacción de CCDA se hizo incubando las células efectoras y "blanco" durante 18 horas a 37°C. Es decir, los porcentajes de ^{51}Cr liberado que se midieron corresponden a la reacción lítica completa. Con el objeto de investigar si las células provenientes de animales tratados manifiestan su actividad citotóxica de manera similar a los normales, o si por el contrario, presentan una velocidad de reacción diferente, se realizó la CCDA por incubación de células efectoras y "blanco" durante diferentes tiempos.

En la figura 6 se muestra que, efectivamente, las células tratadas con Cf expresan su actividad lítica a mayor velocidad que las células normales. Estos resultados indicarían que las primeras poseen mayor número de $\text{RFc}\gamma$ eficientes para mediar CCDA y de esta forma provocarían más lesiones en la membrana de los Ep que liberarían más rápidamente el ^{51}Cr con que se los marcó.

Figura 6: Cinética de la reacción de CCDA mediada por células normales y tratadas con ciclofosfamida:



Se inocularon ratones BALB/c con 200 mg/kg de peso de Cf en forma i.p. A los 7 días se midió la actividad de los esplenocitos para mediar CCDA, incubando $0,5 \times 10^6$ células de bazo junto con $0,1 \times 10^6$ eritrocitos de pollo marcados con ^{51}Cr y sensibilizados con anticuerpos específicos. A los tiempos indicados en la figura se determinó el porcentaje de CCDA de células normales (O—O) o tratadas con Cf (●--●).

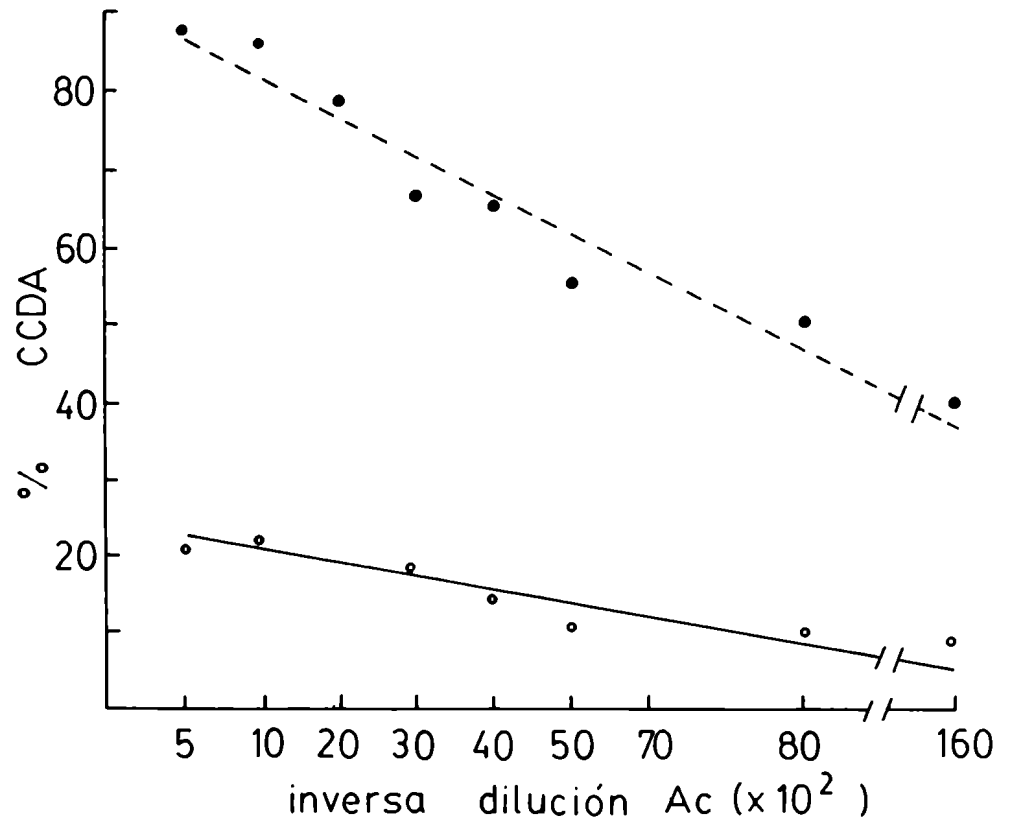
Cada valor representa la media de 3 animales. Se realizaron 3 experimentos posteriores obteniéndose resultados similares.

3) Sensibilización de los Ep con distintas cantidades de anticuerpos:

El aumento de la actividad citotóxica provocado por la Cf podría deberse a un incremento en la avidéz del RFc γ de las células tratadas hacia las células "blanco" sensibilizadas. Para investigar esta posibilidad, las últimas se sensibilizaron con distintas concentraciones de Ac de manera tal de comparar la actividad lítica de las células normales y tratadas con Cf en estas condiciones.

Los resultados que se muestran en la figura 7 indican que la Cf no incrementa la avidéz del RFc γ , ya que la actividad lítica va decreciendo de manera similar en ambos grupos a medida que disminuye la concentración del Ac sensibilizante. Si los RFc γ de las células tratadas con Cf tuviesen mayor avidéz hacia la inmunoglobulina que sensibiliza a la célula "blanco", se esperaría que a altas diluciones del Ac estas células mantuviesen su capacidad citotóxica mientras que la de los esplenocitos normales debería desaparecer. O lo que es igual un incremento en la avidéz del RFc γ por efecto de la Cf se reflejaría en una pendiente menos pronunciada comparada con la normal. Por el contrario, en la figura 7 se observa que en el caso de células tratadas la pendiente es levemente más pronunciada que la normal.

Figura 7: Relación entre la cantidad de anticuerpos sensibilizantes y la actividad de CCDA de células normales y tratadas con ciclofosfamida:



Ratones BALB/c fueron inoculados con 200 mg/kg de Cf por vía i.p. y a los 7 días se sacrificaron, estudiándose la actividad de CCDA de sus esplenocitos. Se enfrentaron $0,5 \times 10^6$ células normales (○—○) o provenientes de animales tratados (●---●) contra $0,1 \times 10^6$ eritrocitos de pollo marcados con ^{51}Cr y sensibilizados con las distintas concentraciones de anticuerpos indicadas en la figura. Las mezclas se incubaron 18 horas a 37°C.

4) Relación entre el número de esplenocitos totales y los que expresan RFc γ :

Debido a la acción de la Cf, el número de esplenocitos en los ratones tratados es menor que en los controles. La droga podría eliminar en forma selectiva a las células no efectoras de la CCDA, produciéndose así un enriquecimiento en células con RFc γ . Esta sería la explicación más sencilla para entender la actividad lítica incrementada de los esplenocitos tratados con Cf.

Cuando se cuantificaron las células que expresan RFc γ por formación de rosetas EA (eritrocitos + Ac específico) no se hallaron diferencias significativas entre los dos grupos (tabla 1). Es decir, que a pesar de que los bazo de los animales inoculados con Cf tienen, al cabo de 7 días, alrededor del 50% del número de células que tienen los bazo normales, la proporción de esplenocitos con RFc γ es similar en todos los ratones.

5) Duración del efecto de una única dosis de Cf sobre la CCDA:

En la figura 8 se muestran los cambios secuenciales en la actividad de CCDA que siguen al tratamiento con Cf. Se ve que el pico de incremento de la lisis se produce al séptimo día post-inoculación. Los valores van descendiendo gradualmente hasta alcanzar porcentajes de CCDA normales alrededor del día 20.

Tabla 1: Efecto de la ciclofosfamida sobre el número de esplenocitos totales y las rosetas EA (RFc γ^+):

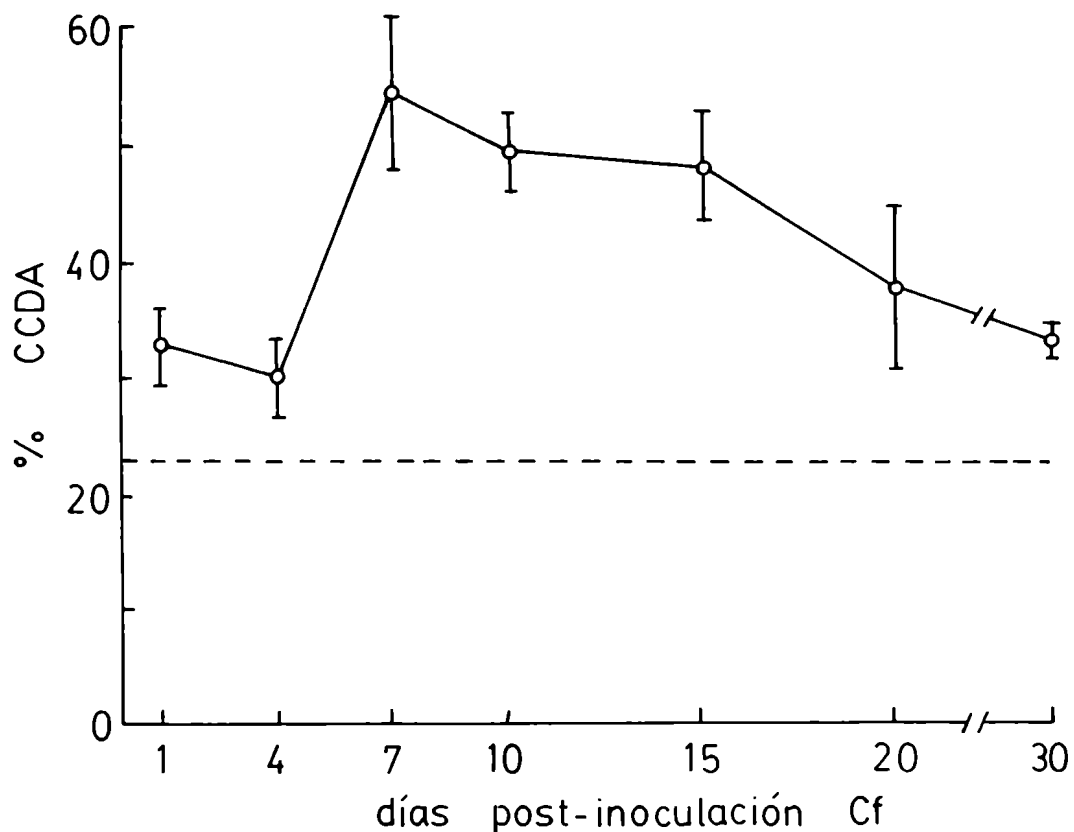
tratamiento	esplenocitos (x 10 ⁶)	rosetas EA (%)
ninguno	190,5 \pm 54,2	11,7 \pm 1,7
Cf(200mg/kg)	91,0 \pm 1,7	11,2 \pm 1,3

La Cf fue inoculada por vía i.p. 7 días antes de la obtención de las células esplénicas.

Las rosetas EA se realizaron por incubación de volúmenes iguales de eritrocitos de pollo sensibilizados (suspensión al 0,5%) y esplenocitos en una relación 5-10 eritrocitos por célula de bazo, durante 30-60 minutos a 37°C.

Los resultados son la media \pm DS de 4 animales.

Figura 8: Duración del efecto de la ciclofosfamida sobre la actividad de CCDA:



Se inocularon ratones BALB/c con 200 mg/kg de Cf. Los ensayos de CCDA se llevaron a cabo usando $0,5 \times 10^6$ esplenocitos y $0,1 \times 10^6$ eritrocitos de pollo marcados con ^{51}Cr y sensibilizados como células "blanco".

Cada punto representa la media \pm ES de 4 animales.

La línea discontinua representa la media de 3 animales que no recibieron tratamiento alguno (grupo control)

6) Efecto de la Cf sobre la CCDA mediada por células no esplénicas:

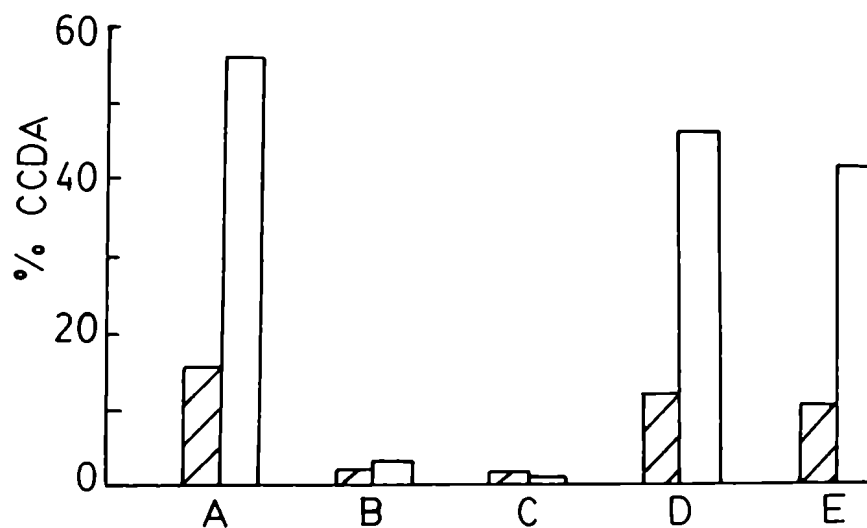
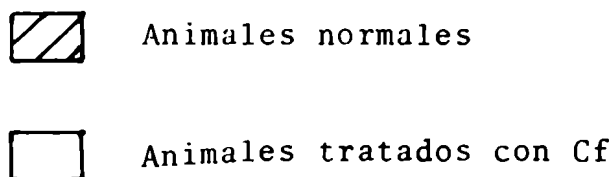
Se investigó si el efecto de la Cf sobre la actividad citotóxica también se ejercía sobre otras células efectoras no esplénicas. Para esto se aislaron células de ganglios linfáticos, exudado peritoneal, leucocitos polimorfonucleares (PMN) y mononucleares de sangre periférica y timocitos. Otros autores han demostrado que las células obtenidas de ganglios y de timo tienen una actividad en CCDA muy baja, ya que las células con RFc γ están en baja proporción en el ganglio y son prácticamente inexistentes en el timo (113,117). En la figura 9 se muestran resultados similares y se ve que el tratamiento con Cf no altera estos bajos porcentajes de CCDA.

Por otra parte, los leucocitos PMN y mononucleares de sangre periférica se separaron por centrifugación sobre Ficoll-Hypaque. Las células mononucleares que permanecen en la interfase presentaron una baja contaminación de PMN; sin embargo, la fracción de leucocitos PMN que se obtiene en el fondo del tubo de centrifugación estuvo contaminada con células mononucleares, especialmente en el caso de sangre proveniente de ratones normales. Como no fue posible remediar esta contaminación alterando la densidad del Ficoll-Hypaque, ni variando el tiempo o la temperatura de centrifugación, se añadieron células mononucleares a los PMN tratados para que ambas poblaciones estuviesen en igualdad de condiciones. Es decir, las suspensiones de células PMN normales y tratadas con Cf que se usaron en los experimentos de CCDA contuvieron similares porcentajes de células mononucleares contaminantes. Como se observa en la figura 9, las células efectoras de CCDA obtenidas de sangre periférica (PMN o mononucleares) manifiestan un incremento en su actividad lítica por efecto de la Cf.

Cuando se intentó estudiar la capacidad para mediar CCDA de las células de exudado peritoneal normales y tratadas con Cf, se presentó el inconveniente de la citotoxicidad inespecífica. Esto es, los macrófagos y PMN de exudado peritoneal son capaces de lisar espontáneamente células "blanco" no recubiertas por Ac específicos cuando se los incuban juntos durante 18 horas. Esta citotoxicidad inespecífica alta se superpone con la CCDA imposibilitando la medición de ésta última. Para minimizar este inconveniente, la reacción de CCDA utilizando células de exudado peritoneal se realizó por incubación de 3 horas. En este tiempo, la liberación de ^{51}Cr por efecto de la citotoxicidad inespecífica no sobrepasa el 5%.

Los resultados mostrados en la figura 10 parecen indicar que también en el caso de células de exudado peritoneal, el tratamiento con Cf incrementa su actividad citotóxica. Estos porcentajes, sin embargo, no pueden compararse con los graficados en la figura 9 ya que la reacción citotóxica se llevó a cabo en un tiempo mucho más corto.

Figura 9: Efecto de la ciclofosfamida sobre la CCDA mediada por células no esplénicas:



Los ratones BALB/c fueron inoculados con 200 mg/kg de Cf 7 días antes de realizarse los ensayos de CCDA, usándose en todos los casos $0,1 \times 10^6$ eritrocitos de pollo marcados con ^{51}Cr y sensibilizados como células "blanco".

A: Células de bazo ($0,5 \times 10^6$ por tubo de reacción)

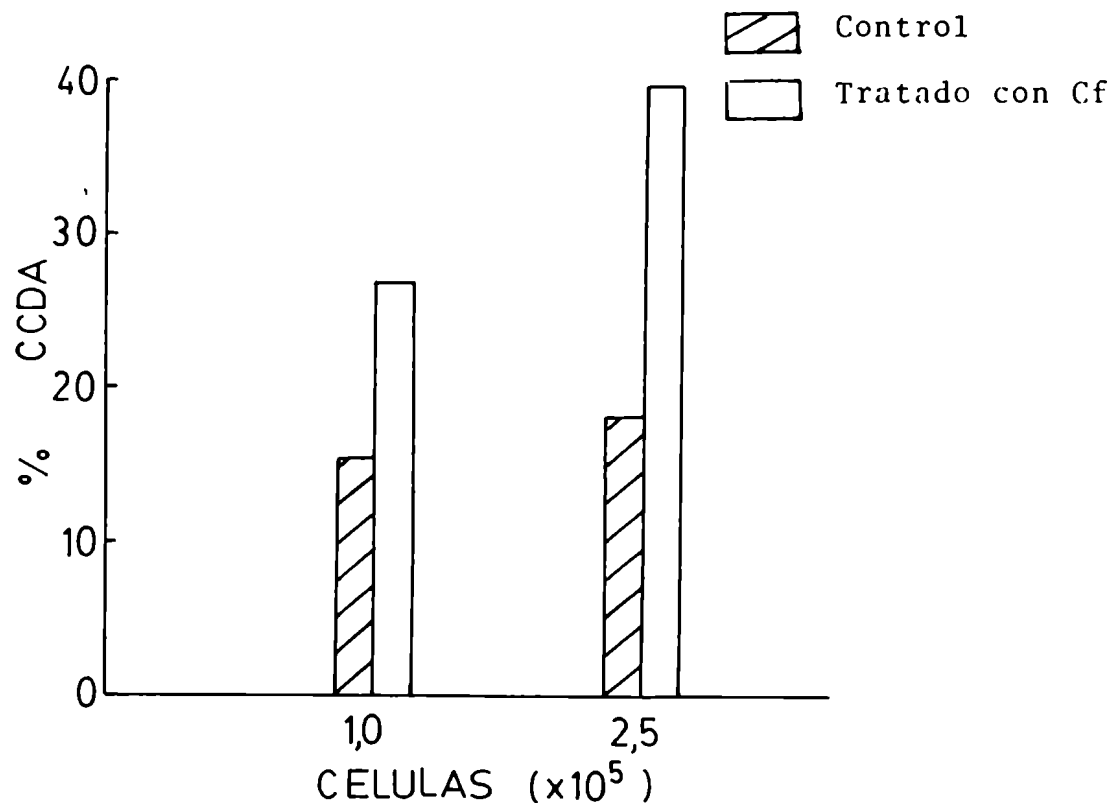
B: Células de ganglios linfáticos ($1,0 \times 10^6$)

C: Células de timo ($1,0 \times 10^6$)

D: Células mononucleares de sangre periférica ($0,5 \times 10^6$)

E: Células polimorfonucleares de sangre periférica ($0,5 \times 10^6$)

Figura 10: Efecto de la ciclofosfamida sobre la CCDA mediada por células de exudado peritoneal



Se inocularon ratones BALB/c con 200 mg/kg de Cf y siete días más tarde se estudió la actividad de CCDA de las células del exudado peritoneal, en las cantidades indicadas en la figura. Como células "blanco" se utilizaron eritrocitos de pollo marcados con ⁵¹Cr y sensibilizados con anticuerpos. Las mezclas de células efectoras y "blanco" se incubaron durante 3 horas a 37°C.

Cada punto representa la media de duplicados. Se realizaron 4 experimentos más dando resultados similares.

7) Efecto de la Cf sobre la respuesta primaria de Ac y la hipersensibilidad retardada:

El efecto de exacerbación de la CCDA provocado por el tratamiento con Cf se comparó con otras funciones inmuno-lógicas sobre las Cuales la Cf también ejerce su acción. Se estudiaron, en particular, la respuesta primaria de Ac y la hipersensibilidad retardada hacia glóbulos rojos de carnero (GRC). Los animales fueron inoculados con la droga dos días antes de la sensibilización con el Ag vía intraperitoneal como se describe en Materiales y Métodos. Cinco días después, fueron desafiados inyectándoles el Ag en la almohadilla plantar izquierda y a las 24 horas se les midió el grosor de la misma comparándolo con el tamaño del día anterior. Al mismo tiempo, los animales fueron sangrados y en los sueros obtenidos se determinó el título de Ac anti-GRC por el ensayo de hemaglutinación directa. Finalmente, los esplenocitos de estos ratones se utilizaron como células efectoras de la CCDA.

Los resultados que se muestran en la tabla 2 indican que el tratamiento con 200 mg/kg de Cf suprime la síntesis de Ac específicos, mientras que aumenta la respuesta de hipersensibilidad retardada contra el mismo Ag y la actividad de CCDA. La inoculación de 20 mg/kg de Cf no altera ninguna de las tres respuestas.

Tabla 2: Efecto de la ciclofosfamida sobre la producción de anticuerpos, la hipersensibilidad retardada y la CCDA:

tratamiento	n	HR ^a (índice HP)	título aglutinante	CCDA (%) ^b
ninguno	6	18,17 ± 3,86	1:160	16,8 ± 0,1
Cf(20mg/kg)	6	13,07 ± 5,10	1:160	19,0 ± 0,8
Cf(200mg/kg)	7	61,68 ± 7,17	1:20	50,9 ± 3,5

a. El índice de hinchazón plantar (HP) se calculó sustrayendo el grosor de la almohadilla plantar el día del desafío al tamaño medido 24 horas después.

b. Media ± ES de triplicados.

II- Acción de la Cf sobre la fagocitosis:

Una vez determinada el efecto exacerbador que ejerce la Cf sobre la CCDA, se investigó su acción sobre otra función que depende de la expresión del RFc γ sobre la célula efectora: la fagocitosis específica. Para esto se aislaron células del exudado peritoneal (macrófagos y leucocitos PMN) de ratones tratados o no con Cf y se ensayó su capacidad fagocítica, tal como se describe en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos indican que la Cf incrementa, no sólo el porcentaje de células fagocíticas del exudado peritoneal, tanto macrófagos como PMN, sino también el número de partículas ingeridas por célula (tabla 3, figura 11). La droga no exagera la fagocitosis inespecífica ya que en los ratones tratados no se observa ingestión de GRC sin opsonizar con Ac, al igual que ocurre en los animales normales.

1) Sensibilización de los GRC con distintas cantidades de Ac:

Para determinar si la Cf incrementaba la fagocitosis induciendo el aumento de la avidéz de los RFc γ , se sensibilizaron los GRC a ingerir con distintas concentraciones de Ac. Como se explicó para la CCDA, si los RFc γ de las células tratadas tuviesen mayor avidéz hacia la inmunoglobulina, es de esperar que a medida que se diluya el Ac estas células mantengan su capacidad fagocítica mientras que las normales se vean imposibilitadas de ingerir los eritrocitos.

Como se puede ver en la figura 12, la actividad fagocítica de las células normales y tratadas va decreciendo en forma paralela a medida que disminuye la concentración de Ac y desaparece al sensibilizar los GRC con una dilución 1:8000.

Tabla 3: Efecto de la ciclofosfamida sobre la fagocitosis de eritrocitos sensibilizados:

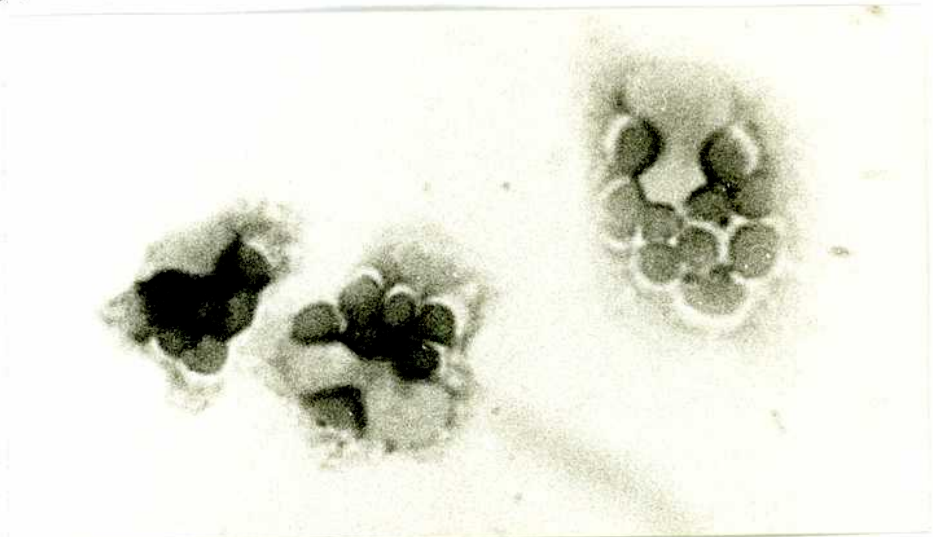
TRATAMIENTO	% CEP con E sensibilizados ingeridos		N° promedio de E ingeridos por CEP	
	macrófagos	PMN	macrófagos	PMN
ninguno	38,9 \pm 3,7	24,4 \pm 3,6	3	2
Cf(200mg/kg)	71,9 \pm 3,0	75,7 \pm 4,2	7	4

Se inocularon ratones BALB/c con Cf (200 mg/kg) por vía i. p. Dos días después se obtuvieron las células del exudado peritoneal y se ensayó su actividad fagocítica hacia glóbulos rojos de carnero, tal como se describe en Materiales y Métodos. Cada valor representa la media \pm ES de seis animales.

Figura 11: Efecto del tratamiento con ciclofosfamida sobre la eritrofagocitosis



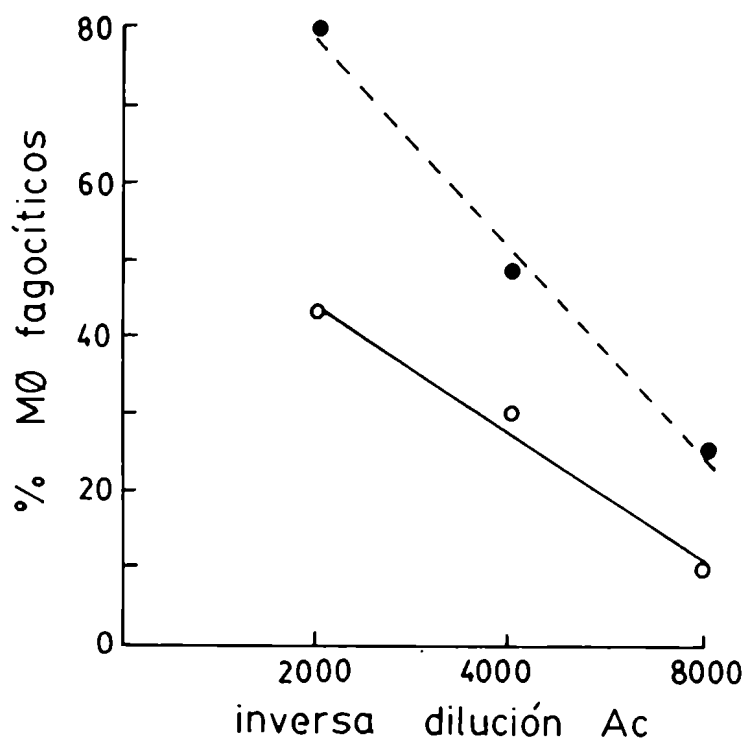
Macrófagos peritoneales normales con eritrocitos ovinos ingeridos (x1000).



Macrófagos peritoneales provenientes de ratones tratados con Cf (200 mg/kg) con eritrocitos ovinos ingeridos (x1000).

Los preparados de células peritoneales fueron coloreados con May Grunwald-Giemsa.

Figura 12: Relación entre la cantidad de anticuerpos sensibilizantes y la capacidad fagocítica de células normales y tratadas con ciclofosfamida:



Ratones BALB/c fueron inoculados con Cf (200 mg/kg) por vía i.p. y a los 2 días se sacrificaron estudiándose la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales (MØ), tal como se describe en Materiales y Métodos. Los eritrocitos de carnero que se usaron como células "blanco" se sensibilizaron con anticuerpos específicos en las cantidades indicadas en la figura.

0—0 Macrófagos normales

●--● Macrófagos tratados con Cf

Cada punto es la media de 3 animales. Se realizaron 2 experimentos más obteniéndose resultados similares.

2) Duración del efecto de una única dosis de Cf sobre la fagocitosis específica:

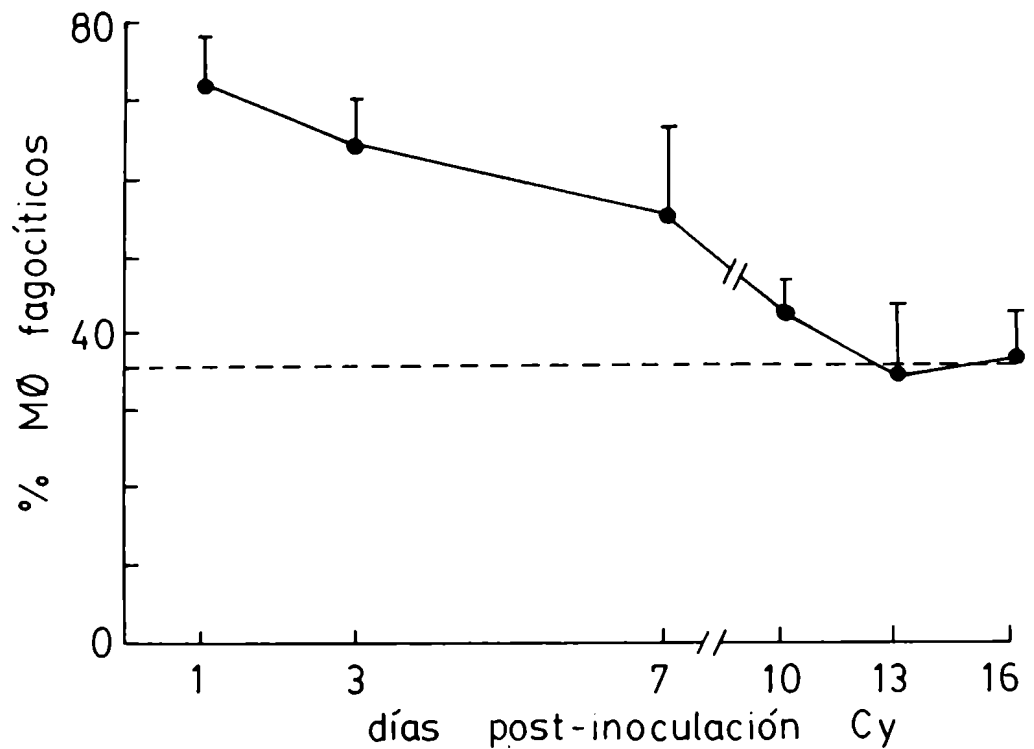
Cuando se midieron los cambios secuenciales en la actividad fagocítica que provoca el tratamiento con una única dosis de Cf, se vio el pico de incremento de la fagocitosis al día siguiente de la inoculación (figura 13). A partir de ese momento, el porcentaje de células con GRC ingeridos va descendiendo gradualmente hasta alcanzar valores normales hacia el día 20 post-inoculación. Es decir, que el pico máximo de actividad fagocítica se alcanza antes que el de CCDA (día 1 contra día 7), pero ambas funciones vuelven a niveles normales a tiempos semejantes.

3) Fagocitosis "in vivo":

Se estudió la capacidad fagocítica "in vivo" de las células del exudado peritoneal, inoculando ratones con GRC sensibilizados con Ac específicos por vía intraperitoneal. Como las células fagocíticas expresan receptores para el componente C3 del complemento, se usó el Ac sensibilizante en diluciones no fijadoras de complemento para evitar la formación de rosetas a través del receptor para C3 (rosetas EAC).

Los animales inoculados con los GRC-Ac se sacrificaron 45 minutos después, se extrajeron las células del exudado peritoneal y se lisaron los eritrocitos con Buffer Tris-ClNH₄. Las células fagocíticas se hicieron adherir a portaobjetos incubándolas 15 minutos a 37°C y finalmente se fijaron, colorearon y observaron al microscopio. Los resultados (tabla 4) indican que los animales tratados con Cf también expresan una capacidad fagocítica exacerbada cuando ésta se lleva a cabo "in vivo".

Figura 13: Duración del efecto de la ciclofosfamida sobre la fagocitosis específica:



Se inocularon ratones BALB/c con 200 mg/kg de Cf. Los ensayos de eritrofagocitosis se realizaron tal como se describe en Materiales y Métodos, determinándose el porcentaje de macrófagos (MØ) con 1 o más eritrocitos fagocitados.

Cada punto representa la media \pm ES de 4 animales.

La línea discontinua representa la media de 3 animales que no recibieron tratamiento alguno (grupo control).

Tabla: Efecto de la ciclofosfamida sobre la fagocitosis específica "in vivo":

tratamiento	Ac	% CEP con E sensibilizados ingeridos
ninguno	1:3000	22,9
	1:6000	24,4
Cf (200mg/kg)	1:3000	77,4
	1:6000	84,1

Ratones BALB/c fueron inoculados con Cf (200 mg/kg) y 2 días después se les inyectó, por vía i.p., 0,5 a 1 ml de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 5% sensibilizados con anticuerpos específicos en las diluciones que se indican en la figura. Los animales se sacrificaron 45 minutos después y se realizaron los ensayos de fagocitosis como se describe en Materiales y Métodos.

En la tabla se señalan los porcentajes de células mononucleares y polimorfonucleares peritoneales (CEP) con eritrocitos (E) ingeridos. Se realizaron 3 experimentos más obteniéndose resultados similares.

4) Acción del tioglicolato sobre la fagocitosis y la CCDA:

Está ampliamente demostrado el efecto exacerbador de la fagocitosis que tienen ciertos agentes inflamatorios como el bacilo Calmette-Guerin (BCG) y el tioglicolato (118). Estas sustancias, inoculadas por vía intraperitoneal, incrementan notablemente el número de macrófagos y leucocitos PMN del exudado peritoneal y los activan, provocando, entre otros efectos, un aumento en su capacidad fagocítica. Con el objeto de determinar si la Cf actúa de manera similar a estos agentes inflamatorios, se estudió el efecto del tratamiento con tioglicolato sobre la CCDA y la fagocitosis de GRC sensibilizados. Los animales que recibieron una única dosis de tioglicolato, fueron sacrificados al tercer o séptimo día post-inoculación. Las células del exudado peritoneal se ensayaron en su capacidad de ingestión de GRC sensibilizados y los esplenocitos en su actividad de CCDA.

Los resultados demuestran que mientras la fagocitosis está marcadamente exacerbada (tabla 5), los niveles de CCDA son similares a los de los ratones normales (figura 14). Estos resultados, y el hecho que la Cf no incrementa el número de células del exudado peritoneal como lo hacen los agentes inflamatorios, sugieren que la acción de la Cf sobre la fagocitosis se lleva a cabo a través de mecanismos distintos.

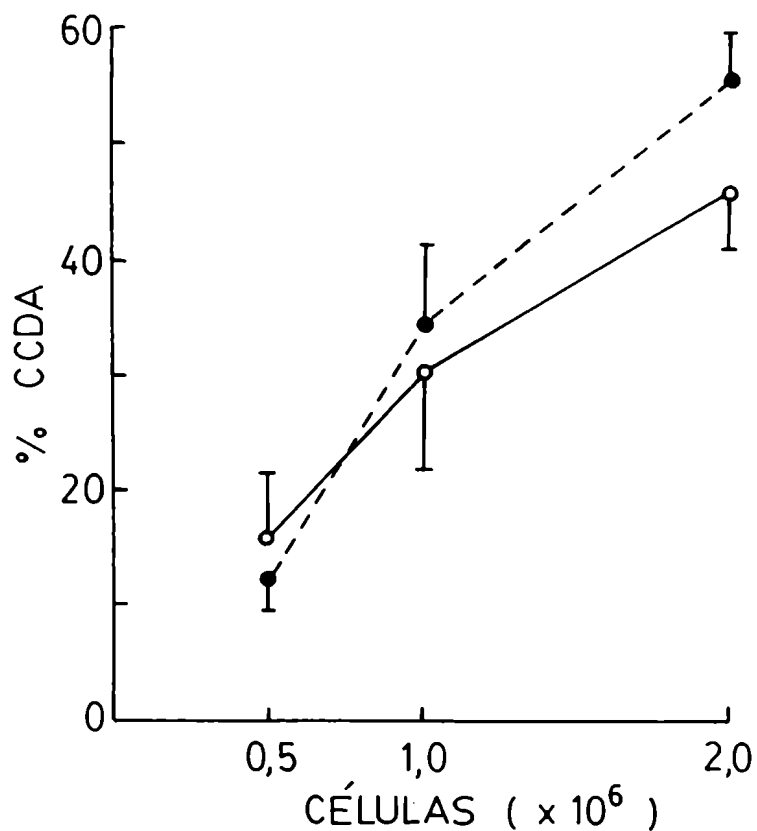
Tabla 5: Efecto del tratamiento con tioglicolato sobre la fagocitosis de eritrocitos sensibilizados:

	TRATAMIENTO	
	ninguno	tioglicolato
DIA		
3	22,0 \pm 2,8	83,3 \pm 8,5
7	19,8 \pm 0,3	67,4 \pm 8,2

Los ratones BALB/c fueron inoculados con 0,5 ml de medio de tioglicolato (0,5 g de tioglicolato de sodio/litro) por vía i.p. y a los 3 o 7 días después se sacrificaron, midiéndose la actividad fagocítica de sus leucocitos peritoneales.

Los resultados representan la media \pm ES de 4 animales.

Figura 14: Efecto del tioglicolato sobre la CCDA:



Se inocularon ratones BALB/c con 0,5 ml de medio de tioglicolato (0,5 g de tioglicolato de sodio/litro) por vía i.p. Una semana más tarde, se midió la capacidad para mediar CCDA de sus esplenocitos, utilizándose como células "blanco" $0,1 \times 10^6$ eritrocitos de pollo marcados con ^{51}Cr y sensibilizados con anticuerpos.

Cada punto representa la media \pm ES de 4 animales normales (O—O) o tratados con tioglicolato (●---●).

DISCUSION:

Los resultados presentados en esta tesis aportan datos para una mejor comprensión de los mecanismos regulatorios de la CCDA y la fagocitosis específica. Si bien estas funciones han sido ampliamente estudiadas en cuanto a sus requerimientos metabólicos, tipo de células que intervienen y diferentes etapas del mecanismo efector en sí, es muy poco lo que se sabe sobre su regulación. En estos trabajos, se encaró el estudio de la modulación de la CCDA y la fagocitosis mediante el uso de la Cf, que al afectar de diferente manera a las distintas poblaciones linfocitarias, es capaz de inhibir o exacerbar las funciones inmunológicas.

En primer lugar, se estudió el efecto provocado por una única dosis alta de Cf sobre la CCDA mediada por linfocitos esplénicos, encontrándose que a los siete días post-inoculación, la actividad citotóxica está significativamente incrementada. Winkelstein y colaboradores (119) estudiaron el efecto de la Cf (150 mg/kg) sobre la CCDA de células de ganglio linfático de cobayos. Encontraron que a los días 2 y 5 post-tratamiento no existían diferencias significativas con los controles sin inyectar y concluyeron que la Cf no afecta la actividad de CCDA. Sin embargo, cuando estudiaron los cambios que se inducen en tiempos más largos, vieron que se producía un aumento moderado de la actividad con un pico a los 12 días post-inoculación. Los autores no consideran que estos aumentos sean significativos y, por lo tanto, no los discuten. Hunninghake y Fauci (120), por su parte, observaron que la Cf (100 mg/kg) no altera la CCDA mediada por células mononucleares periféricas de cobayo a los 5 días de ser inoculada. Estos resultados sólo se pueden comparar parcialmente con los descriptos en esta tesis, ya que se

trata de especies animales distintas, tratamientos con diferentes dosis de Cf y células efectoras provenientes de diferentes compartimentos. El hecho de trabajar con animales de distintas especies es una diferencia importante ya que se ha demostrado que existen variaciones significativas en la susceptibilidad a la droga, aún entre animales de la misma especie pero de distinta cepa. Así, Hurme y colaboradores (121) demostraron que la citotoxicidad directa es suprimida por el tratamiento con Cf de ratones de distintas cepas. Sin embargo, los ratones de la cepa CBA precisan una dosis 5 a 10 veces mayor que los de la cepa C57 Bl/6 para obtener el mismo nivel de supresión.

Los aumentos en la CCDA inducidos por la Cf varían de animal en animal; así, en ciertos experimentos los esplenocitos tratados muestran una capacidad lítica 500% mayor que los animales normales, mientras que en otros, el incremento es de alrededor del 50%. Otros autores han demostrado que no sólo existen variaciones en los valores normales de CCDA entre cepas, sino también entre individuos de una misma cepa. En este sentido, Pollack y Herrick (117), han sugerido que las variaciones individuales en los niveles de CCDA podrían explicarse por diferencias en la actividad regulatoria.

La dosis de Cf inoculada fue de 200 mg/kg de peso y se eligió porque es la que se utiliza corrientemente para provocar alteraciones en las respuestas inmunológicas (7,78,90). Cuando se probaron dosis menores de Cf, se vió que el efecto exacerbador decrece gradualmente con la cantidad inyectada, desapareciendo a dosis de 20 mg/kg. Askenase y colaboradores (98) encontraron que esta última dosis es eficaz para incrementar la respuesta de hipersensibilidad retardada hacia antígenos particulados, pero no alcanza para alterar la producción de anticuerpos hemaglutinantes. Sin embargo, en nuestra experiencia la ino-

culación de 20 mg/kg de Cf no induce cambio alguno en las respuestas inmunes medidas. Otros autores tampoco fueron capaces de provocar alteraciones de la inmunidad por inoculación de dosis tan bajas de Cf.

El aumento de la actividad citotóxica inducido por la Cf alcanza su máximo nivel al séptimo día después de la inoculación y va disminuyendo gradualmente hasta volver a valores normales alrededor del día 20. Ya que el derivado activo de la droga permanece en la sangre unas pocas horas antes de ser metabolizado, el efecto sobre las células debe ser necesariamente muy rápido. De hecho, la acción citotóxica de la Cf se observa en pocas horas luego de su ingreso al organismo. Al día siguiente del tratamiento el número de esplenocitos y de células de ganglios linfáticos disminuye a la mitad. Winkelstein y colaboradores (122) demostraron que tanto las células B como las T de sangre periférica y de ganglios son afectadas por la Cf en dosis altas. Los linfocitos T recuperan su capacidad de proliferación ante el estímulo de mitógenos específicos alrededor del octavo día post-inoculación. Los linfocitos B permanecen suprimidos hasta el día 14.

En el día séptimo post-tratamiento, los bazo de los animales inoculados con Cf no han recuperado aún su número normal de células. Una posible explicación del aumento de la CCDA en estos ratones sería la eliminación selectiva de las células no citotóxicas, con el consiguiente enriquecimiento proporcional en células efectoras de CCDA. Como se utiliza la suspensión total de esplenocitos para las reacciones, si los bazo tratados estuviesen enriquecidos en células efectoras se esperaría obtener una actividad citotóxica más alta que con células normales usando la misma cantidad de esplenocitos. A fin de determinar el número de células capaces de mediar CCDA, se cuantificó a a-

quellas que expresan RFc γ por formación de rosetas con eritrocitos de carnero recubiertos por anticuerpos (rosetas EA). Los resultados obtenidos (tabla 1) indican que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de células con RFc γ en bazo de animales normales o tratados con Cf. Hunninghake y Fauci (120) obtuvieron resultados similares trabajando con leucocitos purificados de sangre periférica de cobayo. En conclusión, el incremento de la actividad de CCDA inducido por la Cf no puede atribuirse a la eliminación selectiva de los esplenocitos no citotóxicos (sin RFc γ).

La actividad lítica aumentada podría deberse, entonces, a alguna(s) de las siguientes razones: 1) incremento de la avidéz del RFc γ hacia el anticuerpo que recubre a la célula "blanco".

2) aumento en el número de RFc γ funcionales por célula efectora.
3) aumento en la capacidad de la célula efectora para inducir la lisis, ya sea por modificación intrínseca de la misma o por eliminación de mecanismos de regulación negativos.

El incremento en la avidéz del RFc γ permitiría que las células de los animales tratados con Cf sean funcionales en CCDA a concentraciones de anticuerpos sensibilizantes a las que las células normales no podrían actuar. Para comprobarlo se realizaron experimentos recubriendo a las células "blanco" con cantidades decrecientes de anticuerpos y se encontró que tanto las células normales como las tratadas disminuían su actividad lítica en forma parecida (figura 7). Estos resultados indican que el aumento de la CCDA inducido por la Cf no se debe al incremento de la avidéz del RFc γ .

La posibilidad que la Cf induzca la expresión de RFc γ funcionales en la membrana celular se exploró de manera indirecta

ta a través del análisis de la cinética de la reacción. La cuantificación directa de los $\text{RFc}\gamma$ no se realizó ya que los métodos habituales dan resultados muy poco claros cuando se trata de medir receptores no citofílicos como los de los esplenocitos. Estas técnicas, que se usan para comparar cantidades de receptores en distintas poblaciones celulares, utilizan gamaglobulina agregada o complejos inmunes marcados radioactivamente. Según el número de cuentas por minuto medidas por igual número de células se determina la mayor o menor expresión de receptores. Sin embargo, el tamaño de los agregados de gamaglobulina o el de los complejos inmunes es variable, por lo tanto la radioactividad que se une a cada receptor también varía. El análisis de la cinética de la reacción de CCDA (figura 6) indica que los esplenocitos provenientes de animales tratados con Cf ejercen su actividad citotóxica a mayor velocidad que los esplenocitos normales. Ya que la acción lítica se mide por la liberación de ^{51}Cr al sobrenadante por parte de la célula "blanco", es lícito pensar que las células tratadas provocan mayor número de lesiones que las normales en un tiempo menor. Esta mayor capacidad lítica puede estar relacionada con la aparición de $\text{RFc}\gamma$ sobre la membrana de la célula tratada o con la activación de los ya existentes que pudieran estar en un estado no funcional. Es decir, el estudio de la cinética de la reacción no nos permite resolver si hubo síntesis "de novo" de receptores por efecto de la Cf o si la droga permitió que se expresen funcionalmente receptores ya presentes que no eran eficientes para mediar CCDA. De todas formas, se puede afirmar que el tratamiento con Cf no sólo incrementa la capacidad citotóxica de los esplenocitos, sino que también modifica la cinética de la reacción que alcanza valores máximos en tiempos menores.

La Cf podría ejercer su efecto actuando directamente sobre la célula efectora o indirectamente a través de otras célu-

las que regulen la actividad de CCDA. En tal sentido, Pollack y Herrick (117) han demostrado que los esplenocitos murinos mediadores de CCDA pueden ser inhibidos por linfocitos de ganglios linfáticos autólogos. La supresión, que se ejerce a través de la secreción de factores solubles, se ha descrito también con linfocitos periféricos humanos (125). Estos resultados sugieren que las células efectoras de CCDA se hallan normalmente inhibidas de expresar todo su potencial citotóxico. La Cf podría eliminar o inactivar a las células supresoras de la CCDA y, de esta forma, permitir que las células efectoras actúen en el máximo de sus posibilidades.

Las células efectoras de la CCDA son muy heterogéneas. Se han descrito no sólo células linfoides, como los linfocitos K y T, sino también monocitos, macrófagos y polimorfonucleares efectoras (24,25). En el bazo, la actividad de CCDA se debe fundamentalmente a células linfoides y éstas son las que se ven afectadas por la Cf. Con el objeto de ver si otros tipos celulares que participan también de las reacciones citotóxicas son alteradas por la Cf, se aislaron células de timo, ganglios linfáticos, exudado peritoneal y sangre periférica y se ensayaron en CCDA. Los timocitos y células de ganglios mostraron niveles muy bajos de CCDA como lo habían demostrado otros autores (113, 117), y no se vieron afectados por el tratamiento con Cf. En cuanto a las células del exudado peritoneal, compuesto por una alta proporción de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, tuvieron una actividad de CCDA incrementada por la Cf, pero ésta no pudo compararse estrictamente con la del bazo ya que las reacciones se realizaron a tiempos mucho más cortos. Esto se debió a que las células del exudado peritoneal tienen la capacidad de lisar en forma inespecífica a las células "blanco" cuando se incuban juntas por tiempos prolongados. La lisis inducida inespecíficamente enmascara la mediada a través de anticuerpos por

lo que se debe acortar el tiempo de incubación.

Para probar la actividad de CCDA de las células de sangre periférica se separaron previamente los leucocitos mononucleares de los polimorfonucleares por centrifugación sobre Ficoll-Hypaque. Las células mononucleares están constituidas fundamentalmente por linfocitos, ya que los monocitos circulantes en el ratón son sólo el 1% de los leucocitos de la sangre (126). La actividad citotóxica de estas células se ve significativamente incrementada por acción de la Cf (figura 9). En cuanto a los polimorfonucleares no fue posible purificarlos razonablemente, ya que, a pesar de haberse efectuado diversas alteraciones a la técnica de separación, siempre se obtuvieron contaminados con células mononucleares, en especial cuando provenían de animales normales. Por lo tanto, se decidió añadir células mononucleares a los polimorfonucleares tratados para que tuviesen una proporción de células contaminantes similar a los normales. Las suspensiones enriquecidas en leucocitos polimorfonucleares provenientes de ratones inoculados con Cf mostraron una CCDA significativamente mayor que los controles. En conjunto, estos resultados señalan que la acción de la Cf se ejerce sobre todas las células mediadoras de la CCDA del organismo.

Una vez analizado el efecto de la Cf sobre la CCDA, se quiso estudiar las alteraciones que provoca el esquema de tratamiento utilizado sobre otras funciones inmunológicas. Se eligieron para investigar las respuestas de producción de anticuerpos y de hipersensibilidad retardada ya que éstas han sido las funciones mejor estudiadas en relación con la Cf (7,10,78). La droga se inoculó dos días antes de la inmunización con glóbulos rojos de carnero y, a los cinco días, los animales fueron desafiados recibiendo el antígeno en la almohadilla plantar. Al día siguiente, se midieron las respuestas de producción de anticuerpos hemaglutinantes, de hipersensibilidad retardada y de CCDA en ca-

da ratón. Los resultados obtenidos (tabla 2) son coincidentes con los de otros autores en cuanto a que una dosis alta de Cf inoculada dos días antes de la inmunización suprime la producción de anticuerpos contra ese antígeno y exacerba la hipersensibilidad retardada (90,98). La inmunización no alteró el efecto de la Cf sobre la actividad de CCDA, ya que ésta se vió incrementada al igual que ocurre en los animales no inmunes.

Como ya se señaló, el incremento de la CCDA inducido por la Cf probablemente ocurra a través de la inducción de RFc γ sobre la membrana de las células efectoras. De ser así, se esperaría que otras funciones dependientes de la expresión de RFc γ también sean reguladas por la Cf. Se decidió entonces investigar el efecto de la droga sobre la fagocitosis específica. Esta función es de crucial importancia en la defensa del organismo contra la invasión de agentes infecciosos (50,53). Además, las células fagocíticas del sistema retículo-endotelial son las encargadas de eliminar de la circulación los complejos inmunes que normalmente se forman con la aparición de los anticuerpos (127). Sin embargo, es muy poco lo que se conoce sobre su regulación.

Los ratones fueron tratados con una única dosis intraperitoneal de Cf (200 mg/kg) y se extrajeron las células del exudado peritoneal a los siete días, midiéndose su capacidad para ingerir eritrocitos de carnero. Los resultados señalan que tanto los macrófagos como los leucocitos polimorfonucleares tienen una actividad fagocítica muy aumentada. Este aumento se produjo en el porcentaje de células con partículas ingeridas y en el número de partículas fagocitadas por célula. No hubo ingestión de eritrocitos sin sensibilizar con anticuerpos, lo que sugiere que la acción de la Cf se produjo sobre el RFc γ y no activando de manera inespecífica a la célula.

También se probó realizar la fagocitosis "in vivo"

inoculando los eritrocitos de carnero sensibilizados en el peritoneo de ratones tratados o no con Cf. Una hora después, las células del exudado peritoneal se hicieron adherir a portaobjetos por una incubación de 10 minutos a 37°C y se colorearon para contar las que hubiesen fagocitado eritrocitos. Los ratones tratados con Cf mostraron una actividad fagocítica aumentada, al igual que ocurre cuando la reacción se lleva a cabo "in vitro".

Aún cuando la CCDA y la fagocitosis dependen de la actividad del RFc γ celular, ambas funciones implican mecanismos efectores distintos. En la CCDA, la unión de la célula "blanco" con la célula efectora a través del RFc γ inicia una serie de eventos a nivel de la membrana celular que finalizan con la destrucción extracelular de la célula agredida. En la fagocitosis, en cambio, la unión a través del RFc γ induce a la célula efectora a emitir pseudópodos que rodean a la partícula opsonizada y provocan su ingestión. Esa partícula puede o no ser destruída en el citoplasma. Los resultados que se muestran en la figura 12 indican que la Cf no altera la avidéz de los RFc γ de las células fagocíticas, como tampoco alteraba el de los esplenocitos mediadores de CCDA.

Cuando se midieron los cambios secuenciales en la actividad fagocítica luego de la inoculación de Cf, se comprobó que el pico de incremento ocurre al día siguiente del tratamiento. Luego, los porcentajes de fagocitosis van descendiendo gradualmente hasta alcanzar valores normales alrededor del día 13 post-inoculación. Es de destacar que los picos de exacerbación de CCDA y fagocitosis no coinciden. Este hecho sugeriría que los mecanismos regulatorios de ambas funciones son diferentes, aún cuando no es posible compararlas en forma estricta ya que se midieron utilizando células provenientes de distintos compartimentos.

Existen ciertas sustancias inflamatorias, como el bacilo de Calmette-Guerin (BCG) y el tioglicolato, capaces de aumentar la actividad fagocítica de las células peritoneales por inducción de una reacción inflamatoria (118). En estos casos, se produce un aumento marcado en el número de células del exudado peritoneal, especialmente macrófagos, que se activan adquiriendo una serie de características bioquímicas y fisiológicas (128). La exacerbación de la fagocitosis inducida por la Cf parece estar mediada por mecanismos distintos a los involucrados en estas reacciones inflamatorias. Por un lado, el tratamiento con Cf no sólo no incrementa el número de células del exudado peritoneal, sino que tiende a disminuirlo. Además, la capacidad para mediar CCDA de los esplenocitos tratados con tioglicolato es similar a la de las células normales (tabla 5).

Como ya se señalara en la introducción de esta tesis, la Cf es una droga muy usada para el tratamiento de enfermedades causadas por deposición de complejos inmunes, como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoidea (72,74). Es particularmente notable su acción beneficiosa en ciertas vasculitis necrotizantes como la granulomatosis de Wegener, que ha sido estudiada, en los últimos años, por Fauci y colaboradores con el objeto de dilucidar el mecanismo de acción de la Cf en estas patologías (73,81,129). Empíricamente, se observa que el tratamiento con Cf provoca un mejoramiento muy acelerado de la enfermedad, con la disminución del nivel de complejos inmunes circulantes. Se ha propuesto que la Cf suprime la producción de anticuerpos, impidiendo de esta manera la formación de los complejos inmunes (120). Si bien esta supresión es un hecho comprobado, llama la atención la rapidez con que se revierte el cuadro clínico, que pasa de un estado crítico a la normalidad a la semana de iniciado el tratamiento con dosis diarias bajas de Cf (73,81). Ya que los complejos inmunes son eliminados de la circulación

por la actividad fagocítica de las células retículo-endoteliales, la exacerbación de dicha actividad daría como resultado un descenso más rápido del nivel de complejos. Los resultados presentados en esta tesis aportan datos que apoyarían una explicación de este tipo para el mecanismo de acción de la Cf en las enfermedades con complejos inmunes circulantes. Si bien la fagocitosis se ensayó con células obtenidas del exudado peritoneal, es lógico pensar que la droga afecta a otras células fagocíticas. Además, el pico de incremento se obtuvo al día siguiente de la inoculación, lo que señala una acción inmediata de la Cf sobre esta función.

En conclusión, los resultados aquí expuestos demuestran que la Cf es capaz de alterar los mecanismos reguladores de dos importantes funciones inmunológicas dependientes del RFc γ : la CCDA y la fagocitosis. Debido a que son muchas las poblaciones celulares que expresan RFc γ y que el mismo está involucrado en diversas funciones efectoras y reguladoras del sistema inmune, es posible que la utilización de la Cf permita, en el futuro, alcanzar una mejor comprensión acerca de la modulación de dichas funciones.

Por otra parte, como ya se ha puntualizado, las células con RFc γ (en especial las células de Kupffer del hígado) son de fundamental importancia para la depuración de complejos inmunes circulantes. La capacidad de la Cf para exacerbar la actividad de los RFc γ , posibilita enfocar el estudio de la inmuneliminación desde una nueva perspectiva, teniendo en cuenta, además, que esta droga resulta de gran eficiencia para el tratamiento de enfermedades con complejos inmunes circulantes.

Resumen

El trabajo experimental presentado en esta tesis se realizó con el objeto de investigar el efecto que ejerce la ciclofosfamida (Cf) sobre dos funciones de importancia como mecanismos inmunes citotóxicos: la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y la fagocitosis específica. Estas funciones dependen de la expresión y actividad de receptores para el fragmento Fc de IgG (R $Fc\gamma$).

El tratamiento de ratones BALB/c con una única dosis de 200 mg/kg de Cf induce un incremento muy significativo en la capacidad para mediar CCDA de las células esplénicas y en la actividad fagocítica de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares del exudado peritoneal. El efecto de la Cf es dependiente de la dosis inoculada desapareciendo a dosis de 20 mg/kg. La actividad lítica de los esplenocitos va aumentando paulatinamente desde el día de la inoculación de la droga y alcanza su pico máximo al séptimo día post-tratamiento; luego, los porcentajes de CCDA disminuyen en forma gradual hasta llegar a valores normales alrededor del día 20. En el caso de la fagocitosis, el pico de incremento se alcanza al día siguiente del tratamiento y desciende gradualmente, normalizándose hacia el día 13 post-inoculación.

Los bazos de animales tratados con Cf poseen porcentajes de células con R $Fc\gamma$ similares a los bazos normales, por lo tanto se descarta que haya habido un enriquecimiento en células efectoras de la CCDA por efecto de la droga.

La exacerbación de la capacidad para mediar CCDA o fagocitosis no se debe al incremento en la avidéz del R $Fc\gamma$, ya que cuando se sensibilizan las células "blanco" con cantida-

des decrecientes de anticuerpos, se observa que tanto las células normales como las tratadas disminuyen su actividad en forma parecida.

El análisis de la cinética de la reacción de CCDA indica que las células de los animales tratados con Cf ejercen su actividad citotóxica a mayor velocidad que los esplenocitos normales.

El efecto de la Cf para incrementar la CCDA se lleva a cabo, no sólo sobre células de bazo, sino también sobre leucocitos mononucleares y polimorfonucleares de sangre periférica y células del exudado peritoneal.

El esquema de tratamiento con Cf utilizado en estos trabajos provoca la supresión de la producción de anticuerpos aglutinantes contra glóbulos rojos de carnero, juntamente con el aumento de la hipersensibilidad retardada hacia el mismo antígeno.

La exacerbación de la fagocitosis inducida por la Cf y por agentes inflamatorios parecen mediarse a través de mecanismos distintos. Por un lado, el tratamiento con Cf no incrementa el número de células peritoneales como lo hacen las sustancias inflamatorias, Por otro lado, los esplenocitos tratados con tioglicolato no muestran aumento en su capacidad citotóxica.

Los resultados presentados aportan datos para una mejor comprensión de los mecanismos regulatorios que modulan la actividad de células con $\text{RFc}\gamma$. Además, estos trabajos describen un efecto, hasta ahora desconocido de la Cf, como es la exacerbación de sistemas inmunes citotóxicos.

BIBLIOGRAFIA:

1. Cerottini, J & Brunner, T
Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity. *Adv. Immunology* 18,67 (1974)
2. Landolfo, S; Martinotti, MG & Cavallo, G
Natural macrophage cytotoxicity against Protozoa, en *Natural cell-mediated immunity against tumors*. Ed. por RB Herberman Acad. Press, New York, pag. 1163 (1980)
3. Nelson, DS
Macrophages as effectors of cell-mediated immunity, en *Phagocytes and Cellular Immunity*. Ed. por HH Gadebusch, CRC Press, pag. 57 (1979)
4. Perlmann, P
Cellular immunity: antibody-dependent cytotoxicity (K-cell activity), en *Clinical Immunology III*. Ed. por FH Bach & RA Good, Acad. Press, New York, pag. 107 (1976)
5. Gerber, NL & Steinberg, AD
Clinical use of immunosuppressive drugs. *Drugs* 11,14 (1976)
6. Lin, H
Differential lethal effect of cytotoxic agents on proliferating and nonproliferating lymphoid cells. *Can. Research* 33,1716 (1973)
7. Winkelstein, A; Kift, BL & Sternkoft, EJ
Proc. Conference on Immunopharmacology. Ed. por ME Rosenthal & HC Mansmann, Spectrum Publications Inc., pag. 213 (1976)

8. Turk, JL; Parker, D & Poulter, LW
Functional aspects of the selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide. *Immunology* 23,493 (1972)
9. Berembaum, MC
Time-dependence and selectivity of immunosuppressive agents. *Immunology* 36,335 (1979)
10. Kerhaert, JA; Hofhuis, FM & Willers, JM
Effects of variation in time and dose of cyclophosphamide injection on delayed hypersensitivity and antibody formation. *Cell. Immunol.* 29,232 (1977)
11. Weiser, RS; Myrvick, QN & Pearsall, NN
Fundamentals of Immunology. Ed. por Lea & Febiger, Philadelphia (1969)
12. Muller-Eberhard, HJ
The serum complement system. En *Textbook of Immunopathology*. Ed. por Miescher, PA & Muller-Eberhard, HJ, vol. I. Grunc & Stratton (1976)
13. Parish, WE
Differentiation between cytophilic antibody and opsonin by a macrophage phagocytic system. *Nature* 208,595 (1965)
14. Golub, ES
The cellular basis of the immune response. An approach to immunobiology. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets (1977)
15. Plata, F & Lilly, F
T cell cytotoxicity in mice elicited by immunization with syngeneic tumor cells induced by different strains of mouse

leukemia viruses. En T and B lymphocytes: recognition and function. Symposia on Molecular and Cellular Biology. Ed. por FH Bach; B Bonavida; ES Vitetta & CF Fox, pag. 549 (1979)

16. Zinkernagel, RM & Doherty, PC
H-2 compatibility requirement for T cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. J. exp. Med. 141,1427 (1975)
17. Herberman, RB & Holden, HT
Natural cell-mediated immunity. En Adv. Cancer Res.. Ed. por G Klein & S Weinhouse, S. Academic Press, New York, pag. 27 (1978)
18. Herberman, RB; Bartram, S; Haskill, SJ; Nunn, ME; Holden, HT & West, WH
Fc receptors on mouse effector cells mediating natural cytotoxicity against tumor cells. J. Immunol. 119,322 (1977)
19. Kaplan, J & Callewaert, DM
Expression of human T-lymphocyte antigens by natural killer cells. J. Nat. Cancer Inst. 60,661 (1978)
20. Herberman, RB; Djen, JY; Kay, HD; Ortaldo, JR; Riccardi, C; Bonnard, GD; Holden, HT; Fagnani, R; Santoni, A & Puccetti, P
Natural killer cells: characteristics and regulation of activity. Immunological Rev. 44,43 (1979)
21. Petranyi, G; Kiessting, R; Povey, S; Klein, G; Herzeberg, LA & Wigzell, H
The genetic control of NK activity and its association with in vivo resistance against a Maloney lymphoma isograft. Immunogenetics 3,15 (1976)

22. Moller,E
Contact-induced cytotoxicity by lymphoid cells containing foreign isoantigens. Science 147,873 (1965)
23. Pearson,GR
In vitro and in vivo investigations on antibody-dependent cellular cytotoxicity. En Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Verlag, Berlin, pag. 65 (1978)
24. Greenberg,AH; Shen,L. & Roitt,IM
Characterization of the antibody-dependent cytotoxic cell, a non-phagocytic monocyte? Clin. Exp. Immunol. 15,251 (1973)
25. 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 (1972)
26. Lamon,EW; Whitten,HD; Skurzak,HM; Andersson,B & Lidin,B
IgM antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the Moloney Sarcoma virus system: the involvement of T and B lymphocytes as efector cells. J.Immunol. 115,1288 (1975)
27. Capron,A, Capron,M & Dessaint,J-P
ADCC as primary mechanisms of defense against metazoan parasites. En Progress in Immunology IV. Ed. por Fougereau M & Dausset,J, Academic Press, London, pag. 782 (1980)
28. Kahn-Perles,B; Sire,J; Boned,A & Burgois,A
Putative conformation of mouse Fc receptors. J.Immunol. 125, 1360 (1980)

29. Larsson,A; Ohlander,C & Perlmann,P
In vitro target cell lysis mediated by normal human lymphocytes. Influence of molecular properties and affinity of inducing antibody. Scand.J.Immunol. 4,641 (1975)
30. Scornick,JC
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. II Early interactions between effector and target cells. J.Immunol. 113,1519 (1974)
31. Strom,TB; Garovoy,MR; Bear,RA; Gribik,M; & Carpenter,CB
A comparison of the effects of metabolic inhibitors upon direct and antibody-dependent lymphocyte mediated cytotoxicity. Cell. Immunol. 20,247 (1975)
32. Isturiz,MA & Cardoni,RL
The role of protein synthesis in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Cell. Immunol. 31,332 (1977)
33. Calder,EA; Urbaniak,SJ; Penhale,WJ & Irvine,WJ
Characterization of human lymphoid cell-mediated antibody-dependent cytotoxicity (LDAC). Clin. Exp. Immunol. 18,579 (1974)
34. Garovoy,MR; Strom,TB; Kaliner,M & Carpenter,CB
Antibody-dependent lymphocyte-mediated cytotoxicity mechanism and modulation by cyclic nucleotides. Cell. Immunol. 20,197 (1975)
35. Perlmann,P & Perlmann,H
Contactual lysis of antibody-coated chicken erythrocytes by purified lymphocytes. Cell. Immunol. 1,300 (1970)

36. Perlmann,P & Holm,G
Cytotoxic effect of lymphoid cells. *Adv. Immunol.* 11,117 (1969)
37. Kovithanvongs,T & Dossetor, JB
Antibody-induced cytotoxicity by nonsensitized lymphocytes in humans. *Transplant. Proc.* 5,1739 (1973)
38. Biberfeld,P; Wahlin,B; Perlmann,P & Biberfeld,G
A plaque technique for assay and characterization of antibody-dependent cytotoxic effector (K) cells. *J.Immunol.* 4,859 (1975)
39. Ziegler,H & Henney,C
Antibody-dependent cytolytically active human leukocytes: an analysis of inactivation following in vitro interaction with antibody-coated target cell." *J.Immunol.* 115,1500 (1975)
40. Pollack,S; Heppner,G; Brown,RJ & Nelson,K
Specific killing of tumor cells in vitro in the presence of normal lymphoid cells and sera from hosts immune to the tumor antigens. *Int. J. Cancer* 17,380 (1976)
41. Shore,SL; Nahmias,AJ; Starr,SE; Wood,PA & Mc Farlin,DE
Detection of cell-dependent cytotoxic antibody to cell infected with Herpes simplex virus. *Nature* 251,350 (1974)
42. Lowell,GH; Smith,LF; Artenstein,MS; Nash,GS & Mac Dermott,RP
Antibody-dependent cell-mediated antibacterial activity of human mononuclear cells.I. K lymphocytes and monocytes are effective against meningococci in cooperation with human immune sera. *J. exp. Med.* 150,127 (1979)

43. D'Apice,AJF & Morris,PJ
The role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in renal allograft rejection. *Transplantation* 18,20 (1974)
44. Feldmann,J-L; Becker,MJ; Moutsopoulos,H; Fye,K; Blackman,M; Epstein,WV & Talal,N
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in selected autoimmune diseases. *J. Clin. Invest.* 58,173 (1976)
45. Fefer,A
Immunotherapy of primary Moloney sarcoma virus-induced tumors. *Int. J. Cancer* 5,327 (1970)
46. de Landazuri,MO; Kedar,E & Fahey,JL
Antibody-dependent cellular cytotoxicity to a syngeneic Gross virus-induced lymphoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 52,147 (1974)
47. Pearson,GR & Orr,TW
Antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity against cells expressing Epstein-Barr virus antigen. *J. Natl. Cancer Inst.* 56,485 (1976)
48. Kohl,S; Loo,LS & Pickering,LK
Protection of neonatal mice against Herpes simplex viral infection by human antibody and leukocytes from adult, but not neonatal humans. *J.Immunol.* 127,1273 (1981)
49. Zigmund,SH & Hirsch,JG
Leukocyte locomotion and chemotaxis. *J. Exp. Med.* 137,387 (1973)
50. Bainton,DF
Differentiation of human neutrophilic granulocytes: normal and abnormal. En *The granulocyte: function and clinical utilization.* Ed. por TJ Greenwalt & GA Jamieson, Alan R Liss, New York (1977)

51. Foley, MJ & Wood, WB
Studies on the pathogenicity of group A streptococci II.
The antiphagocytic effects of the M protein and the capsular
gel. J.exp. Med. 110,617 (1959)
52. Wright, AE & Douglas, SR
An experimental investigation of the role of blood fluids in
conection with phagocytosis. Proc. R. Soc. London, Ser B, 72
357 (1903)
53. Stossel, TP
Phagocytosis. N. England J. Med. 290,717 (1974)
54. Jasin, HE
Human heat-labile opsonins: evidence for their mediation via
the alternate pathway of complement activation. J.Immunol.
109,26 (1972)
55. Michi, J & Silverstein, SC
Role of macrophage receptors in the ingestion phase of
phagocytosis. Birth Original Article Series XIV (2),99, The
National Foundation (1978)
56. Wessels, NK; Spooner, BS; Ash, JF; Bradley, MO; Luduena, MA;
Taylor, EL; Wrenn, JT & Yamada, KM
Microfilaments in cellular and developmental processes.
Contractile microfilaments machinery of many types es reversibly
inhibited by cytochalasin B. Science 175,642 (1971)
57. Klebanoff, SJ
Cytocidal mechanisms of phagocytic cells. Progress in
Immunology IV. Ed. por M Fougereau & J Dausset. Acad. Press,
London, pag. 720 (1980)

58. De Chatelet,LR
Phagocytosis by human neutrophils. En Phagocytes and cellular immunity. Ed. por HH Gadebusch, CRC Press, pag. 2 (1979)
59. Klebanoff,SJ
Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. Semin. Hematol. 12,117 (1975)
60. Fernández,FJ; Castellani,O & Kimura,F
Physiological events in the course of growth and differentiation of Trypanosoma cruzi. Genet. Suppl. 61,213 (1969)
61. Silverstein,SC
Endocytic uptake of particles by mononuclear phagocytes and the penetration of obligate intracellular parasites. Amer. J. trop. Med. Hyg. 26,161 (1977)
62. Warren,KS
Granulomatosis inflammation. En Inflammation: mechanisms and control. Ed. por IH Lepow & PA Ward, Academic Press, New York pag. 203 (1972)
63. Stossel,TP
Phagocytosis:recognition and ingestion. Semin. Hematol. 12,83 (1975)
64. Stossel,TP
Quantitative studies of phagocytosis. Kinetic effects of cations and heat-labile opsonin. J. Cell. Biol. 58,346 (1973)

65. Bainton,DF
Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leukocyte granules during phagocytosis of microorganisms. *J. Cell. Biol.* 58,249 (1973)
66. Arnold,H; Bourseaux,F & Brock,N
Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B-518-ASTA) in experimental tumours of the rat. *Nature, Lond.* 181,931 (1958)
67. Brock,N
Pharmacologic characterization of cyclophosphamide (NSC-26271) and cyclophosphamide metabolites. *Cancer Chemother. Rep.* 51, 315 (1967)
68. Connors,TA
Bioactivation and cytotoxicity. *En Progress in Drug Metabolism.* Ed. por Bridges,JW & Chasseaud,LF, John Wiley, London, pag. 41 (1975)
69. Bagley,CM; Bostick,FW & De Vita,VT
Clinical pharmacology of cyclophosphamide. *Cancer Res.* 33,226 (1973)
70. Berembaum,MC & Brown,IN
Prolongation of homograft survival in mice with a single doses of cyclophosphamide. *Nature, Lond.* 200,84 (1963)
71. Glucksberg,H; Storb,R; Fefer,A; Buckner,CD; Neiman,PE; Clift, RA; Lerner,KG & Thomas,ED
Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transpl.* 18,295 (1974)

72. Fosdick,WM; Parsons,JL & Hill,DF
Long term cyclophosphamide therapy in rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum. 12,663 (1969)
73. Fauci,AS; Haynes,BF & Katz,P
The spectrum of vasculitis: clinical, pathologic, immunologic
and therapeutic considerations. Ann. Intern. Med. 89,660 (1978)
74. Ropes,MW
Systemic lupus erythemaosus, Harvard University Press,
Cambridge, pag. 5 (1976)
75. Bardos,TJ; Chmieliwicz,ZF & Hebborn,P
Structure-activity relationships of alkylating agents in
cancer chemotherapy. Ann. N. Y. Acad. Sci. 163,1006 (1969)
76. Buckner,CD; Rudolph,RH; Fefer,A; Clift,RA; Epstein,RB;
Funk,DD; Neiman,PE; Slichter,SJ; Storb,R & Thomas,ED
High-dose cyclophosphamide therapy for malignant disease.
Toxicity, tumor response and the effects of stored autologous
marrow. Cancer 29,357 (1972)
77. Connors,TA; Grover,PL & Mc Loughlin,AM
Microsomal activation of cyclophosphamide in vivo. Biochem.
Pharmacol. 19,1533 (1970)
78. Shand,FL
The Immunopharmacology fo cyclophosphamide. Intern. J.
Immunopharmacol. 1,165 (1979)

79. Brock,N; Gross,R; Hoshorst,HJ; Klein,HD & Schneider,B
Activation of cyclophosphamide in man and animals. Cancer
27,1512 (1971)
80. Stockman,GD; Hein,LR; South,MA & Trentin,JJ
Differential effects of cyclophosphamide on the T and B cell
compartments of adult mice. J.Immunol. 110,277 (1973)
81. Fauci,AS & Wolff,SM
Wegener's granulomatosis: studies in eighteen patients and a
review of the literature. Medicine 52,535 (1973)
82. Asofsky,RA; Cantor,H & Tigelar,RE
Cell interactions in the GVH response. En Progress in
Immunology. Ed. por B Amos, Academic Press, pag. 369 (1971)
83. Turk,JL & Poulter,LW
Selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide.
J.Immunol. 10,285 (1972)
84. Stender,HS: Strauch,D.; Winter,H. & Textor,W
The effect of cyclophosphamide on antibody formation with
fractional and massive dosage. Arzneimittel-Forsch 13,1031
(1963)
85. Howard,JG & Courtenay,BM
Induction of tolerance to polysaccharides in B lymphocytes
by exhaustive immunization and during immunosuppression with
cyclophosphamide. Eur. J. Immun. 4,603 (1974)
86. Shand,FL & Howard,JG
Cyclophosphamide inhibited B cell receptor regeneration as a
basis for drug-induced tolerance. Nature,Lond. 271,255 (1978)

87. Turk, JL & Parker, D
Further studies on B-lymphocyte suppression in delayed hypersensitivity indicating a possible mechanism for Jones-Mote hypersensitivity. *Immunology* 24,751 (1973)
88. Aisenberg, AC & Davis, C
The thymus and recovery from cyclophosphamide-induced tolerance to sheep erythrocytes. *J. exp. Med.* 128,35 (1968)
89. Maury, A & Schwartz, RS
On the mechanism of immunological tolerance in cyclophosphamide treated mice. *Clin. Exp. Immunol.* 6,87 (1970)
90. Turk, JL & Parker, D
Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms. *Immunological Rev.* 65,99 (1982) -
91. Drossler, KL; Kluma, F & Ambrosius, H
The influence of cyclophosphamide and 6-mercaptopurine on the IgG₁ and IgG₂ immune response in guinea pigs. *Immunology* 44, 61 (1981)
92. Parker, D & Turk, JL
The effect of cyclophosphamide pretreatment on B-cell stimulation: dissociation of action on homocytotropic antibody and other B-cell functions. *Immunology* 43,115 (1978)
93. Maguire, HC; Maibach, HI & Minisce, LW
Inhibition of guinea pig anaphylactic sensitization with cyclophosphamide. *J. Invest. Derm.* 36,235 (1961)

94. Turk, JL & Stone, SH
Implication of the cellular changes in lymph nodes during the development and inhibition of delayed type hypersensitivity. En Cell Bound Antibodies. Ed. por Amos, B & Loprowski, H, Wistar Inst. Press, pag. 15 (1963)
95. Kerkhaert, JAM; Berg, J & Willers, JMN
Influence of cyclophosphamide on delayed type hypersensitivity in the mouse. Ann. Immun. Inst. Pasteur 125c, 415 (1974)
96. Ascher, MS; Parker, D & Turk, JL
Modulation of delayed-type hypersensitivity and cellular immunity of microbial vaccines: effects of cyclophosphamide on the immune response to tularemia vaccine. Infect. Immun. 18, 2318 (1977)
97. Scheper, RJ; Parker, D; Noble, B & Turk, JL
The relation of immune depression and B-cell stimulation during the development of delayed hypersensitivity to soluble antigens. Immunology 32, 265 (1977)
98. Askenase, PN; Haylen, BJ & Gershon, RK
Augmentation of delayed type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody responses. J. Exp. Med. 141, 697 (1975)
99. Giampietri, A; Bonmassar, E & Goldin, A
Drug induced modulation of immune responses in mice: effects of 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide (DFIC) and cyclophosphamide (Cy). J. Immunopharmacol. 1, 61 (1978)

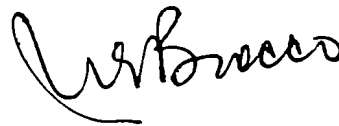
100. Milton, Y.T.; Carpenter, C.B. & Addison, I.E.
Depressed T-cell reactivity and suppressor activity of lymphoid cells from cyclophosphamide-treated mice. *Cell. Immunol.* 24,308 (1976)
101. Elkins, W.L.
Correlation of graft-versus-host mortality and positive CML assay in the mouse. *Transplantation Proc.* 3,343 (1976)
102. Rappeport, J.; Mihm, M.; Reinherz, E.; Lopansri, S. & Parkman, R.
Acute graft-versus-host disease in recipients of bone marrow transplants from identical twin donors. *Lancet* 2,717 (1979)
103. Owens, A.H. & Santos, G.W.
The effect of cytotoxic drugs on graft-versus-host disease in mice. *Transplantation* 11,378 (1971)
104. Glucksberg, H.; Storb, R.; Fefer, A.; Buckner, C.D.; Neiman, P.E.; Clift, R.A.; Lerner, K.G. & Thomas, E.D.
Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 18,295 (1974)
105. L'age-Stehr, J. & Diamantstein, T.
Induction of autoreactive T lymphocytes and their suppressor cells by cyclophosphamide. *Nature* 271,663 (1978)
106. Wander, R.H. & Hilgard, H.R.
Activation and suppression of graft-versus-host reactions by cyclophosphamide. *J. Immunol.* 126,901 (1981)

107. Schwartz,RS & Dameshek,W
Drug-induced immunologic tolerance. Nature,Lond. 183,1682
(1959)
108. Ramshaw,IA; Bretscher,PA & Parish,CR
Regulation of the immune response, II. Reppressor T cells
in cyclophosphamide-induced tolerant mice. Eur. J. Immunol.
7,180 (1977)
109. Shand,FL & Howard,JG
Cyclophosphamide inhibited B cell receptor regeneration as
a basis for drug-induced tolerance. Nature,Lond. 271,255
(1978)
110. Polak,L & Turk,JL
Reversal of immunological tolerance by cyclophosphamide
through inhibition of suppressor cell activity. Nature,
Lond. 249,654 (1974)
111. Bøyum,A
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human
blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (supl. 97),77 (1968)
112. Perlmann,P & Perlmann,H
Contactual lysis of antibody coated chicken erythrocytes by
purified lymphocytes. Cell. Immunol. 1,300 (1970)
113. Kedar,E; Ortiz de Landazuri,M & Fahey,JL
Comparatives studies of immunoglobulin receptors and antibody
dependent cell cytotoxicity (ADCC) in rat lymphoid organ. J.
Immunol. 112,37 (1974)

114. Kabat,EA
Aglutinación. En Inmunoquímica experimental. La Prensa Médica Mexicana, México, Pag. 89 (1964)
115. Asherson,GL & Ptak,W
Contact and delayed hypersensitivity in the mouse.I. Active sensitization and passive transfer. Immunology 15,405 (1968)
116. Cohn,ZA & Benson,B
The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, cytochemistry and biochemistry. J. exp. Med. 121,153 (1965)
117. Pollack,SB & Herrick,MV
Inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by autologous lymph node cells. J. Immunol. 119,2172 (1977)
118. Edelson,PJ; Zwiebel,R & Cohn,ZA
The pinocytic rate of activated macrophages. J. exp. Med. 142,1150 (1975)
119. Winkelstein,A; Brizzi,JA & Kift,BL
The effects of cyclophosphamide on mitogen-induced and ADCC in guinea pigs. J. Immunopharmacol. 1,139 (1979)
120. Hunninghake,GW & Fauci,AS
Divergent effects of cyclophosphamide administration on mononuclear killer cells: quantitative depletion of cell numbers versus qualitative suppression of functional capabilities. J. Immunol. 117,337 (1976)

121. Hurme,M; Bång,BE & Sihvola,M
Genetic differences in the cyclophosphamide-induced immune suppression: weaker suppression of T-cell cytotoxicity by cyclophosphamide activated by CBA mice. Clin. Immunol.and Immunopathol. 17,38 (1980)
122. Winkelstein,A
The effect of immunosuppressive drugs on T and B lymphocytes in guinea pigs. Blood 50,81 (1977)
123. Lobo,PI & Horwitz,DA
An appraisal of Fc receptors on human peripheral blood B and L lymphocytes. J. Immunol. 117,939 (1976)
124. Dickler,HB
Lymphocyte receptors for immunoglobulin. Adv. Immunol. 24, 167 (1976)
125. Pollack,SB & Emmons,SL
Inhibition of human cells by autologous lymphocytes. J. Immunol. 122,718 (1979)
126. Russell,ES & Bernstein,SE
Blood and blood formation. En biology of the laboratory mouse. Ed. por EL Green, McGraw-Hill Book Co., New York,pag. 351 (1966)
127. Theofilopoulos,AN & Dixon,FJ
The biology and detection of immune complexes. Adv. Immunol. 28,89 (1979)

128. Edelson,PJ & Cohn,FJ
Purification and cultivation of monocytes and macrophages.
En In vitro methods in cell-mediated and tumor immunity. Ed.
por BR Bloom & JR David, Academic Press, pag. 333 (1976)
129. Fauci,AS; Katz,P; Haynes,BF & Wolff,SM
Cyclophosphamide therapy of severe systemic necrotizing
vasculitis. N. Engl. J. Med. 301,235 (1979)



DRA. M.M. DE E. DE BRACCO
JEFE INMUNOLOGIA